

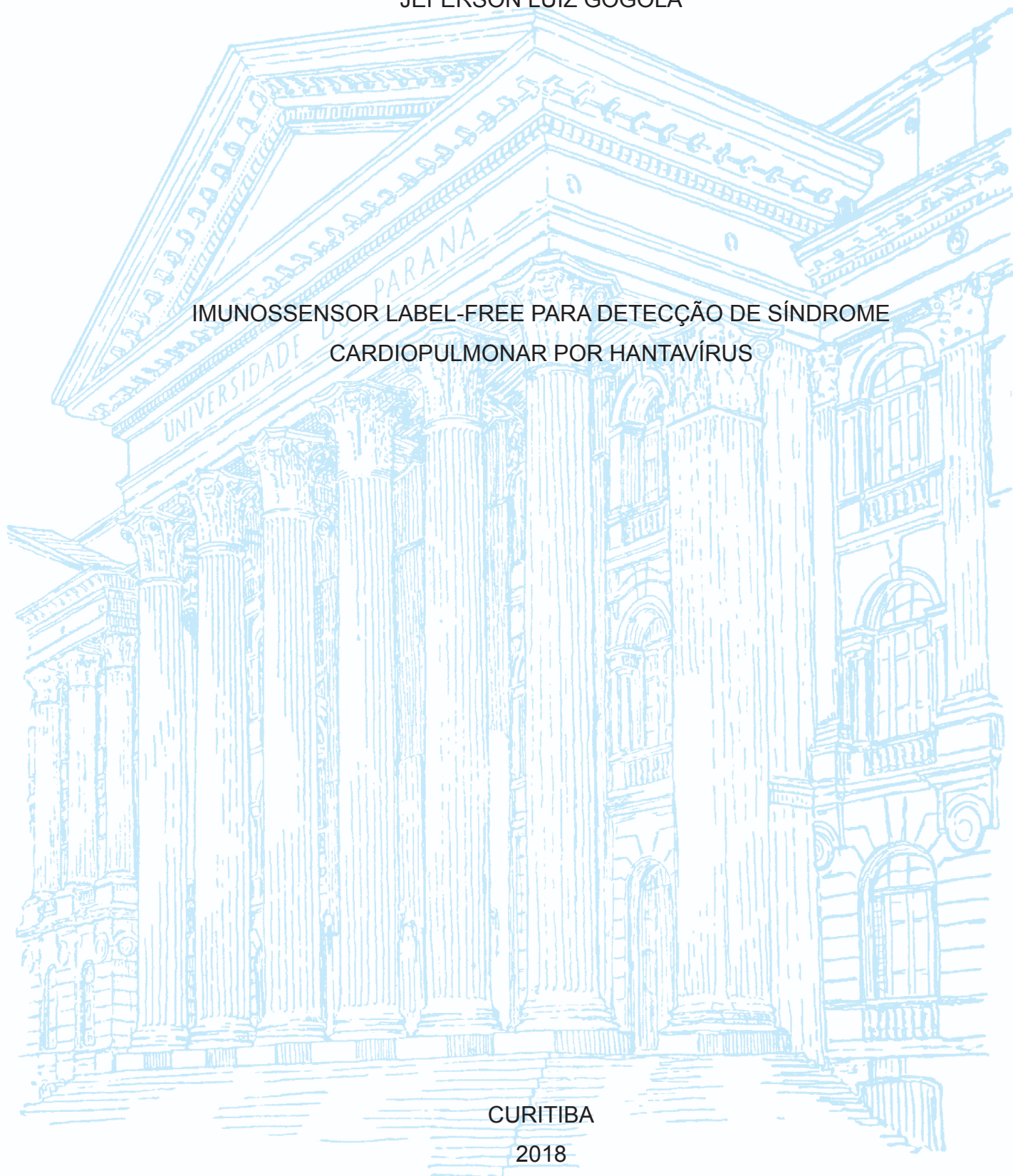
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JEFERSON LUIZ GOGOLA

IMUNOSSENSOR LABEL-FREE PARA DETECÇÃO DE SÍNDROME
CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS

CURITIBA

2018



JEFERSON LUIZ GOGOLA

IMUNOSSENSOR LABEL-FREE PARA DETECÇÃO DE SÍNDROME
CARDIOPULMONAR POR HANTAVÍRUS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

Coorientador: Prof. Dr. Luiz H. Marcolino Junior

CURITIBA
2018

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

G613i

Gogola, Jeferson Luiz

Imunossensor label-free para detecção de síndrome cardiopulmonar por hantavírus [recurso eletrônico] / Jeferson Luiz Gogola. – Curitiba, 2018.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

Orientador: Márcio Fernando Bergamini – Coorientador: Luiz Humberto Marcolino Junior

1. Hantavírus. 2. Infecções por hantavírus. 3. Ouro. 4. Eletroquímica. I. Universidade Federal do Paraná. II. Bergamini, Márcio Fernando. III. Marcolino Junior, Luiz Humberto. IV. Título.

CDD: 616.918

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

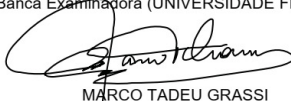
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JEFERSON LUIZ GOGOLA** intitulada: **Imunossensor label-free para detecção de síndrome cardiopulmonar por hantavírus**, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

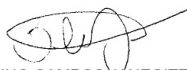
Curitiba, 30 de Janeiro de 2018.


MÁRCIO FERNANDO BERGAMINI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)


MÁRCO TADEU GRASSI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



BRUNO CAMPOS JANEGITZ

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS)

Aos meus pais e meu irmão.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu professor e orientador Márcio Fernando Bergamini pela orientação e pela oportunidade de desenvolver este trabalho, que foi um desafio em conjunto que me fez evoluir tanto como pessoa quanto como pesquisador.

Ao co-orientador Luiz Humberto, pela orientação tanto na pesquisa quanto no futebol de terça.

Aos professores Marco Tadeu Grassi e Bruno José Gonçalves da Silva pelas contribuições no exame de qualificação. Ao professor Bruno Campos Janegitz e novamente ao professor Marco Tadeu Grassi, membros desta banca.

À CAPES e CNPq pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura.

A todos os amigos do LabSense e que eu vou levar para a vida, que todo esse caminho não teria a menor graça se não fosse na companhia de todos.

À minha mãe por todo o suporte e estabilidade que ela sempre lutou para eu ter, e pelo caráter que ela ajudou a construir.

Ao meu pai que mesmo de longe sempre apoia e acredita em todas as minhas decisões.

Obrigado.

“The road and the tale have both been long, would you not say so? The trip has been long and the cost has been high... but no great thing was ever attained easily. A long tale, like a tall Tower, must be built a stone at a time.”

(STEPHEN KING, *The Dark Tower*)

RESUMO

O presente trabalho descreve a preparação e avaliação de um imunossensor para diagnóstico de síndrome pulmonar por Hantavirus. A construção do sensor foi baseada na modificação química de uma superfície de ouro com a nucleoproteína do Hantavírus *Araucaria* e a detecção pela formação do imunocomplexo. A nucleoproteína foi imobilizada no ouro pela formação de uma monocamada auto-organizável (SAM) com ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), seguido da ativação da superfície utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). Medidas de voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e microbalança de cristal de quartzo (QCM) foram realizadas para a avaliação de cada etapa da construção do imunossensor proposto. Diversas condições experimentais foram estudadas e após otimizados os parâmetros da imobilização, o dispositivo mostrou uma boa estabilidade dentro de 21 dias de armazenamento e seletividade para a detecção qualitativa de anticorpos específicos para Hantavírus *Araucaria* (IgG), permitindo a aplicação em amostras reais fortificadas. O imunossensor eletroquímico label-free mostrou uma resposta voltamétrica mais sensível às amostras fortificadas e tem potencial para ser aplicado como uma alternativa para o diagnóstico qualitativo de infecções por Hantavírus.

Palavras-chave: Hantavírus, imunossensores, ouro, eletroquímica, label-free

ABSTRACT

This work describes the preparation and evaluation of an immunosensor for diagnosis of Hantavirus pulmonary syndrome. The sensor construction was based on chemical modification of gold surface with *Hantavirus Araucaria* biomarker and its detection by immunoconjugation response. The nucleoprotein was immobilized onto gold by Self-assembled monolayer (SAM) formation with 3-mercaptopropionic acid (MPA) followed by activation of the surface using 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) e N-hydroxysuccinimide (NHS). Cyclic voltammetry (CV), electrochemical impedance spectroscopy (EIS), and quartz crystal microbalance (QCM) measurements were performed for evaluation of each step involved in the construction of the proposed immunosensor. Several experimental conditions were studied and after optimization of immobilization parameters, the device showed good stability within 21 days and selectivity for a qualitative detection of specific Hantavirus *Araucaria* antibody (IgG), allowing the application in real serum spiked samples. The electrochemical label-free immunosensor showed a sensitive response to the spiked samples and can be employed as an alternative for the qualitative diagnosis of Hantavirus infections.

Key-words: Hantavirus, immunosensors, gold, electrochemical, label-free

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS: IgM E IgG. [1]	16
FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ANTICORPO ESPECÍFICO (IgG). [1]	16
FIGURA 3: ILUSTRAÇÃO DA PRESENÇA DO ANTÍGENO, IgM E IgG NA CORRENTE SANGUÍNEA DURANTE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA. [1].....	18
FIGURA 4: ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS PELO MÉTODO ELISA. [8]	19
FIGURA 5: REAÇÃO DE CONVERSÃO DO TETRAMETILBENZIDINA POR PEROXIDASES CATALISADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.	20
FIGURA 6: FORMATOS DE IMUNOSSENSORES MAIS RECORRENTES NA LITERATURA. [24]	23
FIGURA 7: ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE FORMAÇÃO SOBRE A ORGANIZAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL (SAM).....	25
FIGURA 8: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO.	26
FIGURA 9: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS UTILIZANDO A REAÇÃO COM EDC E NHS.	27
FIGURA 10: ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO NESTE TRABALHO.	27
FIGURA 11: ILUSTRAÇÃO DA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA ESPERADA PARA UMA SUPERFÍCIE LIMPA E PARCIALMENTE BLOQUEADA.....	29
FIGURA 12: CIRCUITO SIMPLES DE RANDLES E ILUSTRAÇÃO DO DIAGRAMA DE NYQUIST ESPERADO.....	31
FIGURA 13: ELETRODO UTILIZADO PARA MEDIDAS DE FREQUÊNCIA POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.	33
FIGURA 14: ESTRUTURA DE UM CRISTAL DE QUARTZO (A) E OS CORTES AT (B) E BT (C) QUE PODEM SER USADOS NA MICROBALANÇA. [40]	34
FIGURA 15: ELETRODO DE DISCO DE OURO UTILIZADO PARA VOLTAMETRIA E EIS.	37

FIGURA 16: CONTADOR DE FREQUÊNCIA, CELA POR BATELADA E CRISTAL DE QUARTZO UTILIZADO. (ESQUERDA PARA DIREITA).....	38
FIGURA 17: VOLTAMOGRAMA CÍCLICO OBTIDO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE OURO, EM H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$	41
FIGURA 18: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA UM ELETRODO DE FIO DE OURO ANTES E APÓS A FORMAÇÃO DA MONOCAMADA COM MUA. MUA 10 mmol L^{-1} , 10 min	43
FIGURA 19: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA ELETRODOS DE OURO SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE FORMAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL COM SOLUÇÃO CONTENDO 10 mmol L^{-1} DE MPA. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	44
FIGURA 20: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA OS ELETRODOS DE OURO APÓS 1 HORA DE FORMAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL EM SOLUÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MPA. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. .	46
FIGURA 21: VARIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DURANTE A FORMAÇÃO DA MONOCAMADA EM UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.....	47
FIGURA 22: MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS <i>Araucaria</i> ; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.	49
FIGURA 23: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS <i>Araucaria</i> ; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.	50
FIGURA 24: MEDIDAS DE FREQUÊNCIA (C) APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS <i>Araucaria</i> ; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO. .	51
FIGURA 25: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO ESPECÍFICO PARA HANTAVÍRUS <i>Araucaria</i>	54
FIGURA 26: PARES DE VOLTAMOGRAMAS ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM ANTICORPO CONTROLE (CAb) (-/-) E ANTICORPO ESPECÍFICO (Ab) (-/-).	

HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO; CAb: ANTICORPO CONTROLE.

.....56

FIGURA 27: A) VOLTAMOGRAMAS DO IMUNOSSENSOR PRONTO A CADA 7 DIAS E OS VALORES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS (INSERIDO); B) VOLTAMETRIA CÍCLICA (40 CICLOS) PARA AVALIAR A ESTABILIDADE ELETROQUÍMICA.....57

FIGURA 28: A) VOLTAMETRIA CÍCLICAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM SORO E SORO FORTIFICADO; 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} EM PBS pH 7,2. B) DIFERENÇA DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO PARA INCUBAÇÕES COM SORO E SORO FORTIFICADO (n = 3) SORO DILUÍDO; C_{Ab} = 100 µg mL⁻¹. HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CONDIÇÕES AVALIADAS E OS MELHORES VALORES OBTIDOS....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	- Ácido desoxirribonucleico (do inglês Desoxyribonucleic acid)
RNA	- Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)
IgM	- Imunoglobulina M
IgG	- Imunoglobulina G
FHSR	- Febre Hemorrágica com Síndrome Renal
SPH	- Síndrome Pulmonar por Hantavírus
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
HRP	- <i>Horseradish peroxidase</i>
TMB	- Tetrametilbenzidina
SAM	- Monocamada auto-organizável (do inglês Self-assembled Monolayer)
MPA	- Ácido 3-mercaptopropiônico
MUA	- Ácido 11-mercaptoundecanóico
EDC	- Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida
NHS	- N-Hidroxisuccinimida
BSA	- Albumina de soro bovino (do inglês Bovine serum albumin)
EIS	- Espectroscopia de impedância eletroquímica (do inglês electrochemical impedance spectroscopy)
QCM	- Microbalança de cristal de quartzo (do inglês Quartz crystal microbalance)
HNp	- Nucleoproteína do Hantavírus <i>Araucaria</i>
Ab	- Anticorpo específico para Hantavírus <i>Araucaria</i>
Cab	- Anticorpo controle

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	HANTAVÍRUS E DIAGNÓSTICO	15
1.2	BIOSSENSORES E IMUNOSSENSORES.....	21
1.3	TÉCNICAS DE DETECÇÃO.....	28
1.3.1	Voltametria	28
1.3.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica	30
1.3.3	Microbalança de cristal de quartzo	32
1.4	JUSTIFICATIVA.....	35
1.5	OBJETIVOS	35
1.5.1	Objetivo Geral.....	35
1.5.2	Objetivos Específicos	36
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1	REAGENTES	37
2.2	ELETRODOS DE OURO E PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DA SUPERFÍCIE	37
2.3	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR	39
3	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	40
3.1	CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR	40
3.1.1	Limpeza e pré-tratamento da superfície dos eletrodos de ouro.....	40
3.1.2	Formação da monocamada auto-organizável com MPA.....	42
3.1.3	Construção do imunossensor e detecção.....	48
3.2	AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO.....	52
3.3	TESTE DE SELETIVIDADE E ESTABILIDADE	55
3.4	APLICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR EM AMOSTRA REAL	58
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
4.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	60
	REFERÊNCIAS	61

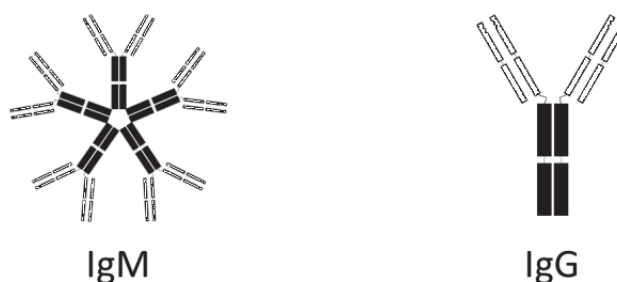
1 INTRODUÇÃO

1.1 HANTAVÍRUS E DIAGNÓSTICO

Vírus são estruturas simples compostas por um invólucro de proteína chamada nucleoproteína que protege o material genético, DNA ou RNA, e sua replicação acontece obrigatoriamente no interior da célula de outros organismos, uma vez que não possuem todo o material bioquímico necessário para produção da própria energia exigida para esse processo. O vírus se utiliza do material biológico do hospedeiro para se reproduzir, um único vírus pode resultar em milhares dentro de poucas horas. [1] Por esse motivo mutações ocorrem facilmente nesses agentes, influenciados pelo material genético e composição celular do hospedeiro, e afetam tanto o material genético do vírus quanto os chamados sítios antigênicos, que são partes específicas do vírus que são identificados pelo sistema imune como não próprio do corpo humano, desencadeando uma reação do sistema do hospedeiro contra esse fragmento. [2]

Quando ocorre uma infecção, o corpo humano tem formas de anular o antígeno através da ação de anticorpos (imunoglobulinas). Anticorpos são glicoproteínas produzidas pelos linfócitos B, que é um componente essencial do sistema imune, e estão normalmente presentes no soro sanguíneo. Imunoglobulinas M (IgM) começam a ser produzidas em uma velocidade maior após a infecção e se ligam a alguns sítios antigênicos enquanto o sistema imune reconhece a espécie estranha, e começa a produzir então os anticorpos específicos para aquele antígeno, na forma de imunoglobulinas G (IgG). Na FIGURA 1 é apresentada uma ilustração das estruturas dos anticorpos IgM e IgG. Como os sítios antigênicos podem ser diferentes entre si, alguns anticorpos específicos são criados, porém, os sítios podem sofrer mutações junto com o material genético, e os IgG criados em uma contaminação anterior reagem parcialmente ao antígeno, ocorrendo a reincidência da doença, como no caso do vírus influenza da gripe comum. [1]

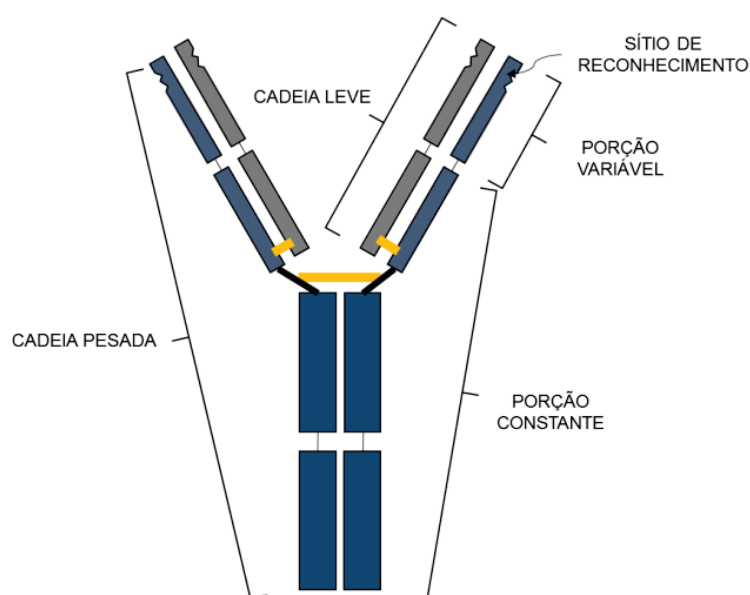
FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO DA ESTRUTURA DOS ANTICORPOS PRODUZIDOS: IgM E IgG. [1]



FONTE: O autor.

Anticorpos específicos (na forma IgG) são estruturas formadas por cadeias leves e pesadas de glicoproteínas, diferenciadas pela quantidade de aminoácidos em sua estrutura. As cadeias pesadas são ligadas entre si por ligações de enxofre, e as cadeias leves ligadas uma em cada cadeia pesada. A região constante está ligada ao transporte e função do anticorpo dentro do organismo, enquanto a porção variável nas pontas corresponde à região que se ligará ao antígeno, sendo responsável pela seletividade do anticorpo. [1] Na FIGURA 2 está ilustrada a estrutura característica de um anticorpo.

FIGURA 2: REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM ANTICORPO (IgG). [1]



FONTE: O autor.

Hantavírus é uma classe de vírus da família *bunyaviridae* que se desenvolve normalmente em roedores, e são transmitidos aos humanos através do contato com as fezes de um animal contaminado. Devido à mutação há registro de diversas variações do vírus, que está diretamente ligada à espécie infectada e a região onde o animal se encontra. A presença no corpo humano pode levar à Febre Hemorrágica com Síndrome Renal (FHSR), normalmente diagnosticada na Ásia, ou Síndrome Pulmonar por Hantavírus (SPH), mais frequente nas Américas. [3]

Apesar da FHSR ser conhecida pelos asiáticos a mais tempo, a doença chamou atenção do mundo ocidental quando cerca de 3200 casos ocorreram dentro das tropas das Nações Unidas durante a guerra da Coreia (1951 a 1954). A rota de infecção e um dos portadores iniciais da doença foram confirmados em 1978, foi descoberto que o soro de pacientes infectados reagiu com o antígeno nos tecidos pulmonares de um rato do campo (*Apodemus agrarius*), e que esse antígeno era transmitido de roedor para roedor. [4,5]

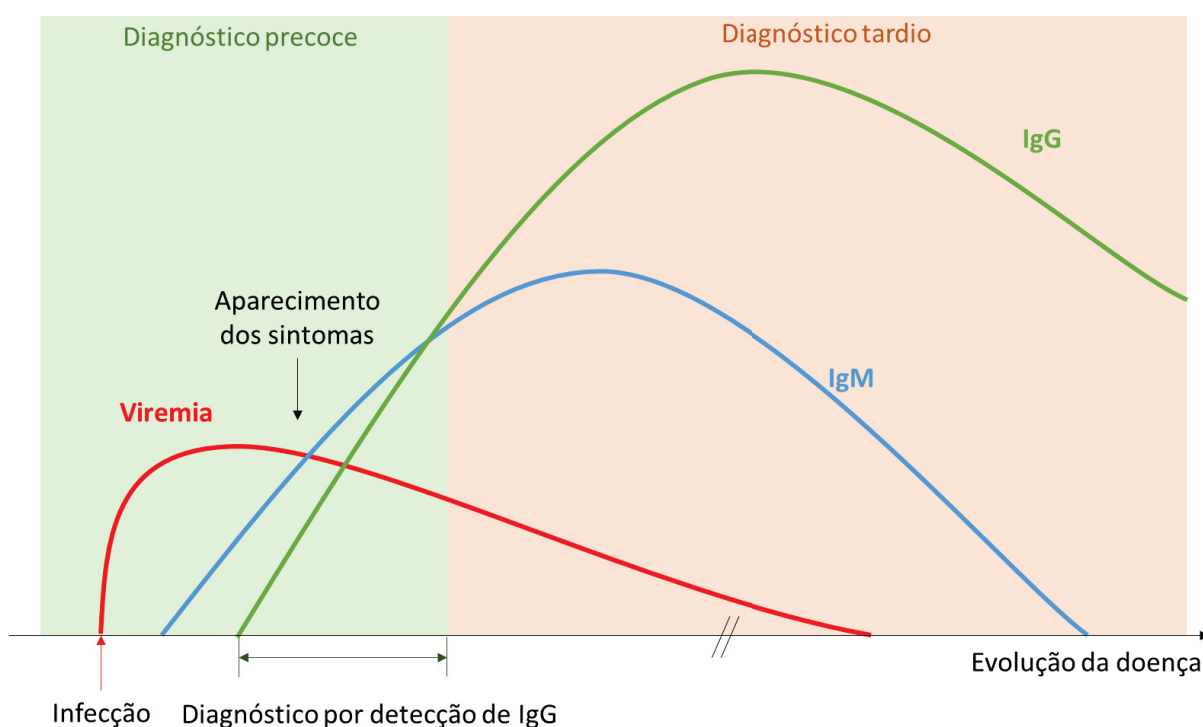
O primeiro caso de SPH foi relatado em 1993 quando focos de casos com insuficiência respiratória de origem desconhecida foram descritos em 4 regiões geograficamente distantes dos Estados Unidos. Assim, de forma inesperada, o soro dos pacientes reagiu parcialmente com os antígenos do Hantavírus (conhecidos pela FHSR), e levou a identificação de uma variação do vírus encontrada tanto nos pacientes como nos roedores apreendidos próximos a suas residências. [6]

A SPH pode causar sintomas como febre alta, dores musculares (mialgia), dor de cabeça, náusea, vômito e diarreia nas fases iniciais, além de tosse seca, falta de ar (dispneia), hipotensão arterial, insuficiência respiratória e colapso circulatório nos estágios mais avançados da doença. [3] A doença é encontrada da Argentina ao Canadá, e até o momento foi confirmada em 15 estados do Brasil. As contaminações ocorrem em cidades rurais, os pacientes são frequentemente do sexo masculino e com faixa etária de 20 a 39 anos. Desde 2004 ocorrem cerca de 120 infecções por ano no Brasil, com uma letalidade média de 46,7% dos casos, porém, não há tratamento específico. [7,8] No estado do Paraná a variação do vírus responsável pelas contaminações é denominada Hantavírus *Araucaria*. [9]

A evolução do quadro clínico é observada entre 2 e 7 dias após o aparecimento dos primeiros sintomas, tornando a detecção rápida da doença um fator importante no tratamento. [10] O diagnóstico a partir dos sintomas do paciente

com SPH é dificultado, pois os sintomas iniciais são semelhantes à da gripe comum (infecção viral causada pelo vírus *Influenza*), e a confirmação da doença é feita somente por meio de procedimentos que utilizam a proteína recombinante para detectar os anticorpos nas amostras, como o teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) e Imunofluorescência indireta. Os dois testes têm como fundamento o reconhecimento seletivo entre o antígeno e o anticorpo produzido, e em que momento eles estão presentes na corrente sanguínea para realizar o diagnóstico, como mostrado na FIGURA 3. [9]

FIGURA 3: ILUSTRAÇÃO DA PRESENÇA DO ANTÍGENO, IgM E IgG NA CORRENTE SANGUÍNEA DURANTE A EVOLUÇÃO DA DOENÇA. [1]

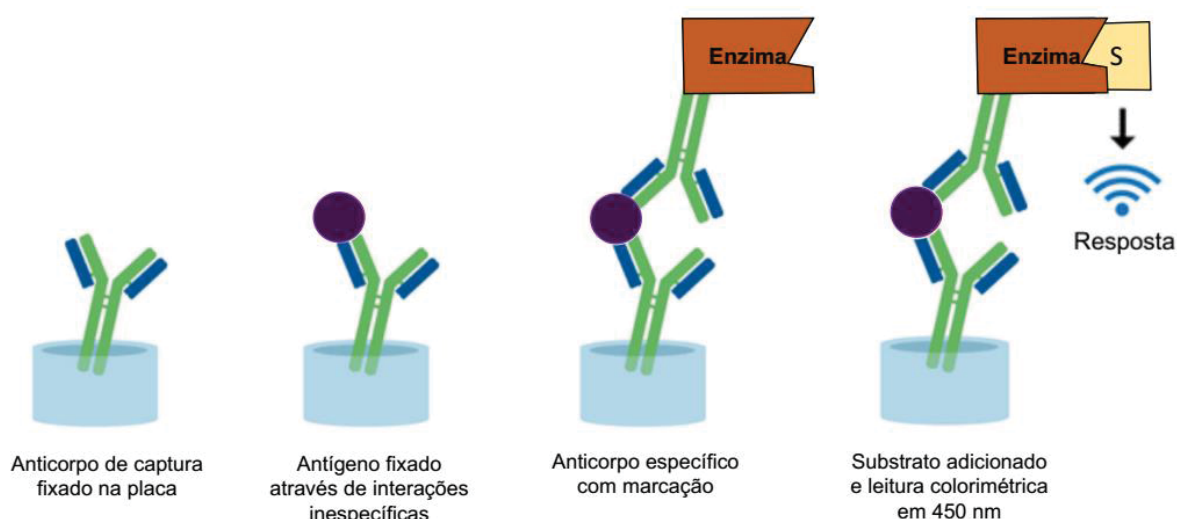


FONTE: O autor.

A nucleoproteína do Hantavírus tem diversos sítios antigênicos e provoca uma reação acentuada do sistema imunológico, sendo alvo tanto dos anticorpos específicos (IgG) como os inespecíficos (IgM). Isso significa que há terminais específicos e inespecíficos onde os anticorpos podem se ligar. A presença do vírus é maior em células endoteliais, mas está presente em maior quantidade no sangue no período antes do aparecimento dos sintomas das doenças, podendo ainda ser encontrado durante a primeira semana dos sintomas. [11]

O teste ELISA consiste na fixação de uma sequência de reagentes em uma microplaca de 96 poços. Diferentes configurações podem ser utilizadas, porém as mais empregadas consistem no formato “sanduíche” onde a ordem de fixação das biomoléculas é: anticorpo de captura-antígeno específico-anticorpo marcado. Após a etapa de reconhecimento, o teste ELISA depende da adição de uma biomolécula marcada por uma enzima, que é responsável pela conversão de um substrato cromogênico, sendo que a leitura da absorbância do substrato em um comprimento de onda específico será proporcional à quantidade de anticorpo na amostra. Os passos que resumem o imunoensaio por teste ELISA estão resumidos na FIGURA 4 [8]

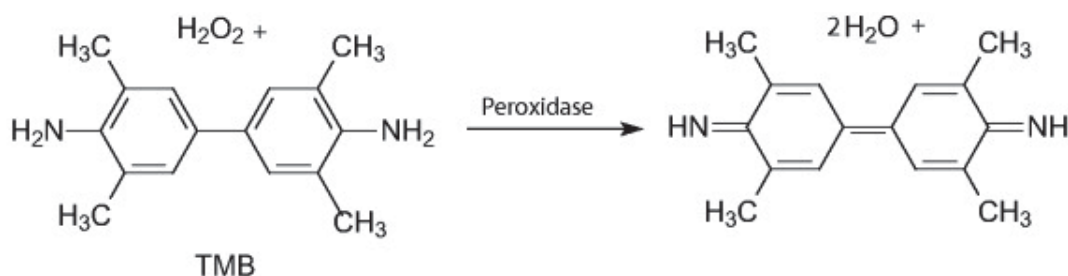
FIGURA 4: ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS PELO MÉTODO ELISA. [8]



Fonte: O autor.

A relativa facilidade no uso e a possibilidade de testar diversas amostras em uma única análise fazem com que o teste ELISA seja uma estratégia muito utilizada para detecção de patógenos. [12] A enzima mais utilizada como marcador nestes ensaios é a *Horseradish Peroxidase* (HRP). A peroxidase é uma enzima que reduz seletivamente H_2O_2 , oxidando algum substrato cromóforo o qual emite um sinal óptico mensurável. Dentre os possíveis substratos, o mais utilizado é a tetrametilbenzidina (TMB), que passa de incolor a azul, a reação é ilustrada na FIGURA 5. Após a adição da solução de “parada”, a solução se torna amarela e a leitura da absorbância da TMB é realizada a 450 nm. [13]

FIGURA 5: REAÇÃO DE CONVERSÃO DO TETRAMETILBENZIDINA POR PERIXODASES CATALISADO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO.



FONTE: O autor.

A imunofluorescência tem etapas semelhantes ao teste de ELISA, entretanto a biomolécula adicionada após o reconhecimento é conjugada ou converte um composto fluorescente. A detecção é baseada na intensidade da fluorescência desse composto, ou seja, também é necessário o uso de técnicas fotométricas para medir a quantidade da espécie de interesse presente na amostra. [14]

A configuração da sequência em que as biomoléculas são fixadas para diagnóstico de SPH é o mesmo do método padrão utilizado, entretanto, a nucleoproteína utilizada é referente a outra variação de Hantavírus (*Andes ou Sin Nombre*). O uso dessa variação leva a uma diminuição da seletividade na detecção de vírus locais, uma vez que as mutações que ocorrem no Hantavírus estão relacionadas com as espécies de roedores portadora do vírus. Isso pode impactar fortemente nos sítios antigênicos da nucleoproteína e dessa forma, uma menor quantidade de anticorpos irá reconhecer esse antígeno parcialmente semelhante. [8,9]

Apesar do uso extensivo do teste ELISA tradicional, os longos tempos de incubação e diversas etapas envolvidas tornam o procedimento exaustivo, além disso, o resultado só é gerado após a conversão do substrato cromogênico. Devido a esses inconvenientes, diversos métodos de detecção vêm sendo elaborados para permitir imunoenaios mais rápidos e de detecção mais fácil. Dentre as diversas possibilidades, destacam-se os biossensores. [15]

1.2 BIOSSENSORES E IMUNOSSENSORES

Biossensor é um sensor utilizado como ferramenta analítica para determinação de diversas espécies de interesse nas mais diversas áreas. Como qualquer sensor, é composto basicamente por dois componentes, o sítio de reconhecimento e um transdutor. Biossensores possuem um material biológico como sítio de reconhecimento, este que identifica as mudanças químicas e biológicas ocorridas em sua superfície, e um transdutor que traduz essas mudanças na forma de um sinal mensurável. Os primeiros biossensores relatados nesse formato foram descritos por Clark e Lyons (1962) utilizando enzimas para a determinação de glicose, e são utilizados até hoje em kits comerciais para medir a glicemia. [16]

As espécies utilizadas na construção de biossensores são biologicamente ativas como as enzimas, DNA (ácido desoxirribonucleico) e anticorpos. Essas espécies reconhecem um analito específico (substrato, fita complementar do DNA, ou o antígeno). O desempenho do biossensor (tempo de resposta, especificidade, seletividade) depende profundamente do par de biomoléculas a ser utilizado. Para isso, a espécie seletiva para o reconhecimento precisa ser imobilizada em uma plataforma adequada para a técnica a ser utilizada na detecção. [17]

O transdutor é fundamental no funcionamento do biossensor pois ele transforma o produto da reação entre a biomolécula e seu substrato, como uma substância biológica, química, luz, som ou calor em dados eletrônicos utilizáveis. Os sinais mais comuns são de natureza eletroquímica e ótica.[17,18] Os biossensores podem ser classificados como detectores diretos (*label-free*) ou indiretos (*labeled*) da espécie de interesse. Essa classificação depende de qual propriedade está sendo medida, sendo que os biossensores indiretos medem o resultado de uma reação que aconteceu devido ao reconhecimento, e os label-free permitem a detecção do fenômeno físico que ocorre quando a espécie bioativa reconhece o substrato. [17]

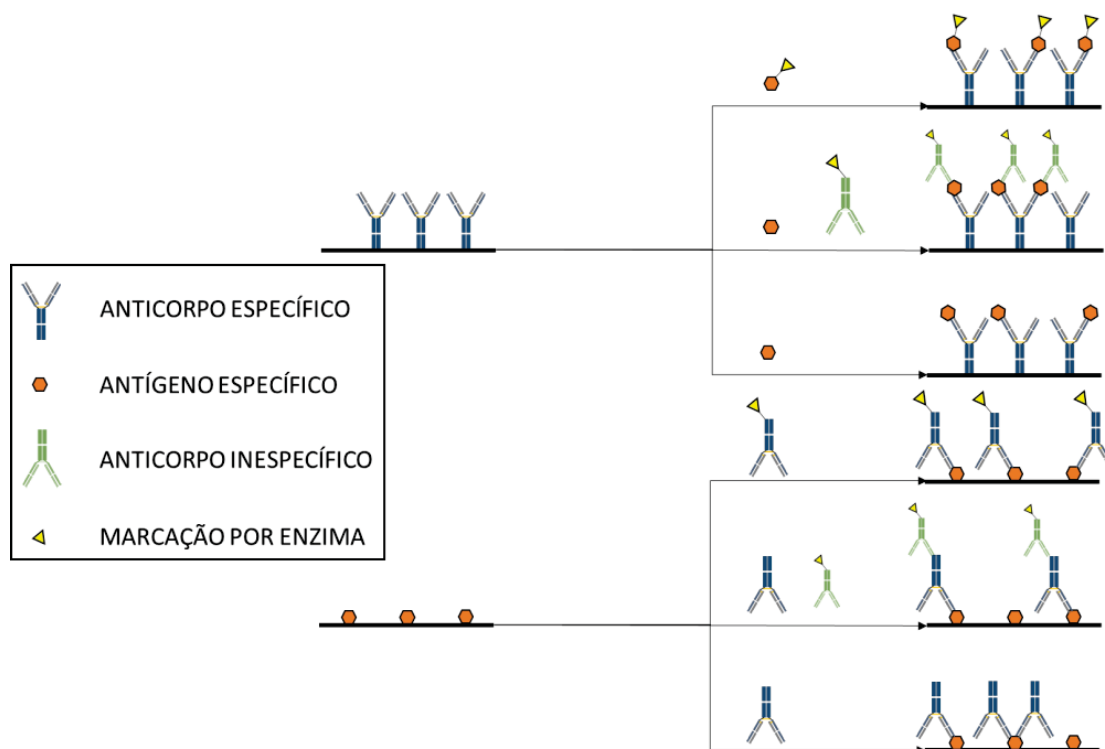
Biossensores indiretos são geralmente dependentes do acoplamento de uma enzima no final do sensor, e o exemplo mais recorrente desse uso é o próprio imunoensaio por ELISA. O procedimento conta com a imobilização da *Horseradish Peroxidase* no anticorpo de detecção, que é responsável por converter um substrato cromogênico (TMB). Após a reação é feita a leitura da absorbância da espécie cromogênica e relacionada com interação entre antígeno e o anticorpo do imunoensaio, caracterizando um biossensor indireto. [19]

As vantagens dos biossensores label-free estão relacionadas ao custo, tempo e manuseio que são eliminados com uma etapa a menos no procedimento de construção do dispositivo. Um dos métodos mais utilizados como detector para biossensores label-free é a microbalança de cristal de quartzo, que detecta uma variação na frequência de vibração de um cristal quando ocorre uma deposição de massa. Um exemplo é o trabalho proposto por Lucarelli et. al, que empregaram esse tipo de estratégia para detectar o reconhecimento de uma fita complementar de DNA. [20]

Além da microbalança de cristal de quartzo, os métodos eletroquímicos se apresentam como alternativas interessantes na construção de biossensores, uma vez que são versáteis e possibilitam o uso de configurações do tipo direta (label-free) ou indireta. Pela determinação indireta, uma enzima que converte uma espécie eletroativa pode ser conjugada, e a análise se dá pela conversão eletroquímica dessa espécie a qual está relacionada com a quantidade de substrato que se ligou à superfície do biossensor. Pela determinação direta é possível medir praticamente qualquer propriedade eletroquímica do eletrodo, pois quando se tem o reconhecimento (interação entre o analito e o sítio de reconhecimento) há um bloqueio parcial da superfície eletroativa resultando em variações de algumas propriedades como um aumento na resistência à transferência de elétrons, possibilitando a medida direta da capacitância ou resistência elétrica do eletrodo sem etapas adicionais. [21,22]

Quando um par antígeno/anticorpo é utilizado na construção do biossensor, o dispositivo é denominado imunossensor. Esse biossensor explora a afinidade entre o anticorpo produzido especificamente para o antígeno, e é empregado como um método alternativo para imunoensaios em questão de diagnósticos. Os formatos utilizados na construção podem variar em função de qual das duas biomoléculas é fixada à superfície como mostrado na FIGURA 6, e essa escolha é baseada nas particularidades da doença em relação a presença das biomoléculas na amostra. Os imunossensores eletroquímicos são muito versáteis com relação a forma de detecção pois, diversas técnicas estão disponíveis para o desenvolvimento de sensores label-free, como voltametria, potenciometria, coulometria, espectroscopia eletroquímica de impedância e microbalança de cristal de quartzo. [13,23]

FIGURA 6: FORMATOS DE IMUNOSSENSORES MAIS RECORRENTES NA LITERATURA. [24]



FONTE: O autor.

Para aplicação das técnicas eletroquímicas na construção de imunossensores é necessária uma plataforma condutora e biocompatível. O ouro é um material inerte que tem pouca propensão em apresentar uma contaminação superficial, e se encaixa nas propriedades necessárias para o desenvolvimento de um biossensor. Eletrodos metálicos oferecem uma cinética de transferência de elétrons rápida e apresentam uma superfície facilmente renovável para aplicação e estudos envolvendo biomoléculas. [25]

O ouro é um dos materiais mais empregados como eletrodo base para construção de imunossensores, porém, é frequentemente relatada a necessidade de um pré-tratamento de superfície para garantir uma condição apropriada para iniciar a preparação do imunossensor. Nesse sentido, diversos estudos são descritos na literatura relatando procedimentos de preparação dessas superfícies para garantir a reprodutibilidade dos sensores. [12] Métodos envolvendo tratamento físico (polimento em pó de alumina), químico ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{SO}_4$) e eletroquímico (dessorção eletroquímica) foram testados e resultados apontaram que o tratamento eletroquímico pode reduzir a rugosidade da superfície e conferir uma boa reprodutibilidade nos resultados. Esse

tratamento consiste na aplicação de uma voltametria de pulso diferencial até potenciais redutivos próximos de -1,2 V (vs Ag/AgCl KCl 3,0 mol L⁻¹). [26] O procedimento de limpeza eletroquímico é importante, pois o eletrodo empregado da microbalança de cristal de quartzo é frágil e não pode ser imerso em solução piranha por conta dos contatos elétricos, sendo necessário o uso de células especiais que limitam a área do eletrodo a ser limpa caso seja necessário o uso desse tipo de tratamento.

Além da limpeza da superfície, a inércia química do ouro exige uma etapa de funcionalização especial para conferir maior reatividade e permitir que as demais camadas necessárias para a construção do imunossensor sejam fixadas na superfície. Para funcionalizar a superfície do ouro o uso de diversos tióis é relatado na literatura, pois a ligação covalente entre o enxofre e ouro é espontânea formando uma monocamada que é chamada de auto-organizável ou SAM (*Self-assembled monolayer*). [27]

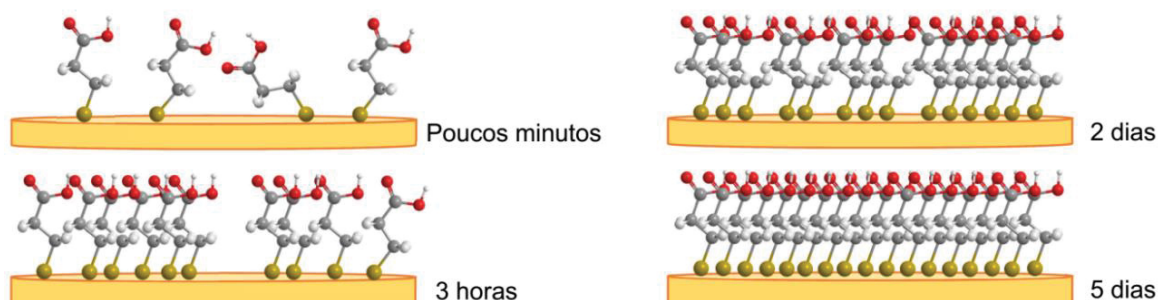
Tióis são compostos orgânicos com o grupo –SH ligado a uma cadeia de carbono, e a maioria desses compostos também dispõe de funções orgânicas, como grupos carboxila ou amina, que permitem uma posterior reação para ligar covalentemente biomoléculas de interesse. A ligação ocorre pela clivagem da ligação S-H do tiol e a formação da ligação com o ouro pela equação 1:



As forças de Van der Waals entre a cadeia carbônica do tiol promove a orientação dos tióis ligados à superfície e facilita a formação de novas ligações, gerando uma monocamada organizada com os hidrocarbonetos em paralelo e inclinados cerca de 30° da perpendicular da superfície. [25]

O tempo de formação da monocamada depende do tiol utilizado, pois uma camada totalmente ordenada e compacta deve ser alcançada, podendo levar dias, como ilustrado na FIGURA 7. A ligação tiol-ouro acontece rapidamente, fazendo do tempo total para a formação da SAM ser definido pela facilidade com que o tiol consegue se organizar na superfície, sendo que esse tempo é maior para moléculas com mais átomos, e ainda maior para cadeias não lineares.

FIGURA 7: ILUSTRAÇÃO DO EFEITO DO TEMPO DE FORMAÇÃO SOBRE A ORGANIZAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL (SAM)

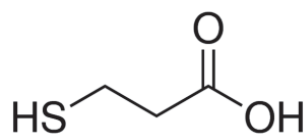


FONTE: O autor.

O uso do ácido 3-mercaptopropiônico, ácido 11-mercaptoundecanóico e o ácido 4-mercaptobenzóico foram empregados na formação de SAM sendo que foi observada uma influência direta do tamanho da cadeia do alcanotiol com relação à estabilidade da monocamada formada. Cadeias maiores levam a uma estrutura mais orientada, ordenada e melhoram a interação da superfície com as moléculas biológicas, porém, diminuem a condutividade do eletrodo muito mais do que os tióis de cadeia curta, inclusive a níveis de bloquear totalmente o sinal de sondas eletroquímicas que dificulta ou até mesmo inviabiliza a medida. [28]

Assim, para medidas eletroquímicas o uso de tióis de cadeia longa é problemático, pois a formação da SAM leva a uma camada muito resistiva que bloqueia totalmente o sinal de uma sonda eletroquímica, impossibilitando a visualização das etapas posteriores. Trabalhos prévios também ressaltam a importância do grupo funcional terminal do tiol, pela facilidade de se ancorar biomoléculas em superfícies com a presença de grupos carboxílicos e aminos, possibilitando o desenvolvimento de um imunossensor na superfície modificada. [29–31] Considerando esses efeitos, o ácido 3-mercaptopropiônico, ilustrado na FIGURA 8, é largamente empregado para a construção de imunossensores que utilizam técnicas eletroquímicas como técnica de detecção [32–34] uma vez que forma uma monocamada que permite a construção do biossensor sem comprometer o sinal da sonda eletroquímica.

FIGURA 8: ESTRUTURA MOLECULAR DO ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO



FONTE: O autor.

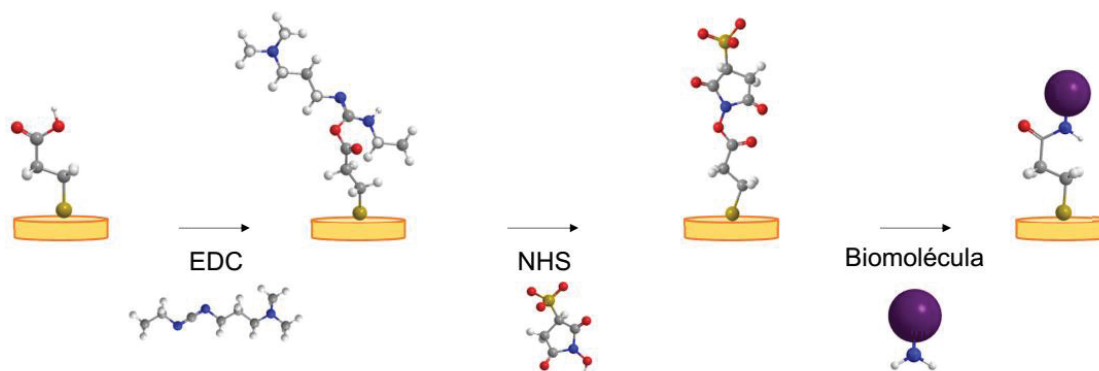
A construção do imunossensor depende da presença do antígeno ou anticorpo na superfície de forma estável, para isso diversos procedimentos para a imobilização de biomoléculas são descritos. Esses procedimentos são divididos em quatro métodos: Adsorção, o uso de agentes de ligação cruzada, aprisionamento em gel e formação de ligação covalente. [35]

Adsorção explora os efeitos eletrostáticos entre o grupo carboxílico terminal da SAM e grupamentos aminicos presentes na biomolécula, esse tipo de modificação requer o conhecimento do pKa dos grupos funcionais envolvidos, e um pH adequado para que a interação entre as cargas ocorra. [29] Aprisionamento em gel é pouco utilizado na construção de imunossensores eletroquímicos pois é um método baseado na criação de uma barreira entre o eletrodo e a solução, que diminui a efetividade das técnicas eletroquímicas e acabam por promover um efeito semelhante aos tióis de cadeias longas.

Os procedimentos mais relatados são baseados na formação de ligação covalente cruzada utilizando um composto que se liga tanto a biomolécula quanto à monocamada, destaque para moléculas como glutaraldeído, 4-fluor-3-nitroazida-benzeno (FNAB), acoplamento de biotina-avidina (utilizado em testes ELISA) e disuccinamidil tereftalato. [29,30]

Uma estratégia mais estável é o uso de agentes químicos para ancorar covalentemente biomoléculas sobre a superfície modificada explorando os grupos carboxílicos da SAM. Para esse fim o uso do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS) é recorrente na literatura pois permite a formação de uma ligação covalente estável entre a SAM e a biomolécula escolhida através de um mecanismo de substituição simplificado na FIGURA 9. O NHS forma um bom grupo abandonador que é substituído por aminas primárias e secundárias de qualquer biomolécula. [31]

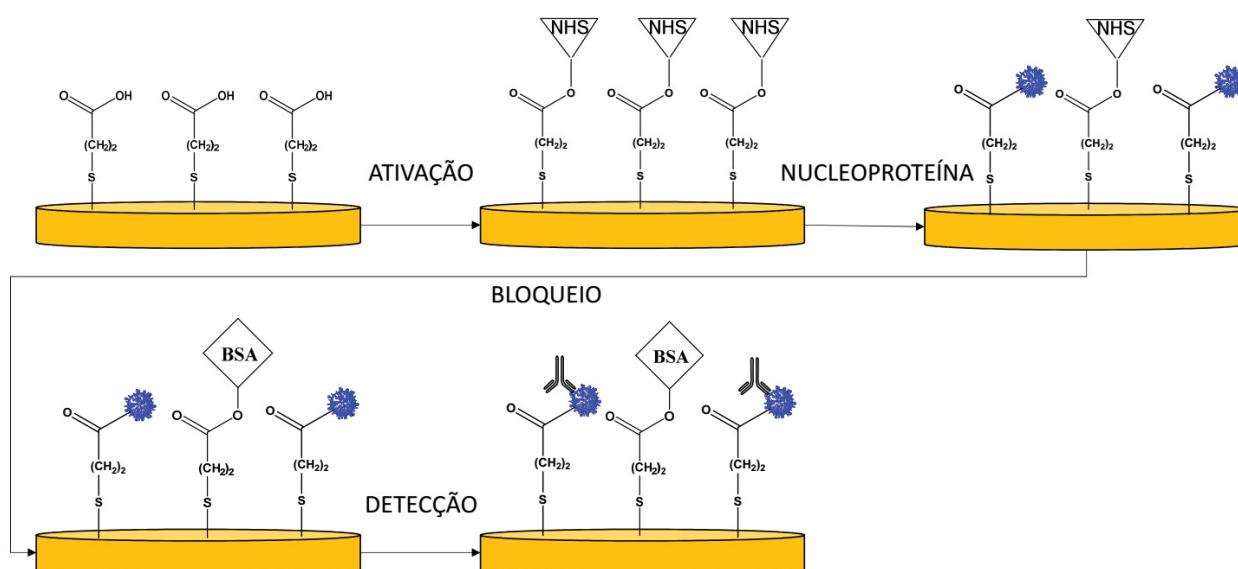
FIGURA 9: ESQUEMA GERAL DA REAÇÃO DE SUBSTITUIÇÃO PARA IMOBILIZAÇÃO DE BIOMOLÉCULAS UTILIZANDO A REAÇÃO COM EDC E NHS.



FONTE: O autor.

Com a biomolécula de interesse ligada covalentemente à superfície de forma estável o imunossensor pode ser utilizado para reconhecer o seu par seletivo em solução. Os passos para a construção do imunossensor proposto estão resumidos na FIGURA 10.

FIGURA 10: ESQUEMA DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR PROPOSTO NESTE TRABALHO.



FONTE: O autor

Depois de preparado o imunossensor, a etapa mais importante para a validação do dispositivo é o teste de seletividade, que é feito comparando a interação entre o anticorpo e o antígeno com a interação entre o antígeno e um

anticorpo controle, que tem estrutura semelhante, mas que não deve se ligar aos sítios específicos da nucleoproteína.

Os imunossensores label-free apresentam problemas de seletividade independente da técnica utilizada, pois o antígeno é composto de sítios específicos e inespecíficos. Ao se utilizar uma amostra real o antígeno pode interagir com os anticorpos IgG no caso de uma amostra positiva e IgM presente em todas amostras de sangue, e até com biomoléculas interferentes que interajam em sítios inespecíficos. Assim, antes de aplicar o sensor é necessária uma última etapa que envolve o uso de agentes de bloqueio como a albumina de soro bovino (BSA). Essas moléculas ajudam em dois sentidos, na substituição de moléculas de NHS ainda presentes na monocamada e no bloqueio de sítios inespecíficos presentes no antígeno. [15]

O uso de agentes de bloqueio não evita que os IgM presentes nas amostras possam se ligar ao antígeno. A quantidade de sítios que os IgM podem se ligar, que são diferentes dos específicos do IgG, dependem da doença, mas espera-se que a quantidade de sítios específicos seja superior. Dessa forma, a amostra sempre apresentará um sinal devido a interação com a esses anticorpos inespecíficos e um sinal maior deve ser verificado caso a amostra seja positiva pois existe uma quantidade maior de interações específicas entre o antígeno e a amostra. [36]

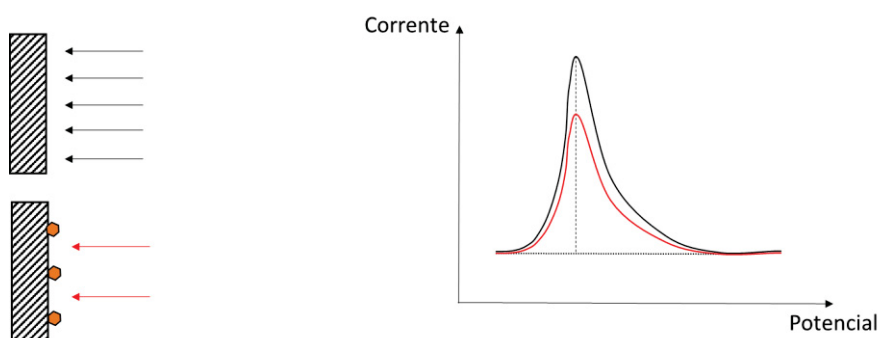
1.3 TÉCNICAS DE DETECÇÃO

1.3.1 Voltametria

A voltametria é uma técnica baseada na medida de uma corrente elétrica em uma célula eletroquímica em função de um potencial aplicado. Existem diversas modalidades de voltametrias as quais estão relacionadas à forma com que o potencial é aplicado ao eletrodo de trabalho (forma de perturbação). Na voltametria linear o potencial é variado de forma linear e constante, e quando atinge valores suficientes para promover a oxidação ou redução de uma espécie eletroativa, ocorre a reação e isso gera uma corrente. Essa resposta resulta em uma onda voltamétrica com altura proporcional à concentração da espécie em solução. Essa conversão também depende da área eletroativa do eletrodo e da eficiência dessa superfície em

promover a transferência eletrônica para a espécie eletroativa. Assim, um bloqueio ou alteração na superfície de um eletrodo reflete em uma variação na taxa de conversão da espécie, diminuindo o sinal eletroquímico. A FIGURA 11 é uma ilustração desse efeito.

FIGURA 11: ILUSTRAÇÃO DA RESPOSTA VOLTAMÉTRICA ESPERADA PARA UMA SUPERFÍCIE LIMPA E PARCIALMENTE BLOQUEADA.



FONTE: O autor.

Esse efeito permite o uso da técnica para analisar mudanças na superfície de eletrodos, inclusive imunossensores, pois a adição de camadas ao eletrodo afeta diretamente a resposta voltamétrica referente a conversão de uma sonda eletroquímica. Assim, é possível avaliar a diminuição do sinal voltamétrico dessa espécie e relacioná-lo ao bloqueio da superfície ativa do eletrodo devido a ligação entre o antígeno e o anticorpo.

A detecção empregando procedimentos voltamétricos é bem difundida no desenvolvimento de imunossensores, por exemplo, Escosura-Muñiz e Merkoçi (2010) desenvolveram um imunossensor label-free utilizando uma estrutura porosa de óxido de alumínio depositada em um eletrodo impresso para ancorar anticorpos. O procedimento consistiu na aplicação de uma voltametria de pulso diferencial em uma solução com $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, sendo observado um pico voltamétrico em $-0,05 \text{ V}$ vs pseudo-referência de carbono. O reconhecimento do antígeno foi evidenciado pela diminuição de sinal voltamétrico do $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, uma sonda eletroquímica amplamente utilizada para visualizar os bloqueios que acontecem na superfície

devido a etapa de detecção de biossensores. A metodologia se mostrou simples, rápida e seletiva para a detecção de proteínas do sangue. [32]

Eissa et al. (2013) exploraram voltametria cíclica como técnica de detecção para avaliar o uso de novos materiais na construção dos dispositivos. Uma superfície de grafeno foi funcionalizada com sal de diazônio de 4-carboxifenil, e através da reação com EDC/NHS os autores ancoraram anticorpos específicos para alergia à ovalbumina. O desempenho foi verificado por voltametria utilizando íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$, onde um pico próximo de 0 V vs Ag metálico foi observado. A interação entre o anticorpo ancorado e o antígeno em solução resultou em uma diminuição do sinal, sendo seletivo para ovalbumina quando comparado com interferentes comuns presente na amostra. [37]

Esses trabalhos exemplificam o amplo uso da voltametria e do método utilizando o sinal de uma sonda eletroquímica para o desenvolvimento de imunossensores. Um aspecto favorável à voltametria linear ou cíclica é que são técnicas simples que estão incorporados em praticamente todos os potenciostatos comerciais.

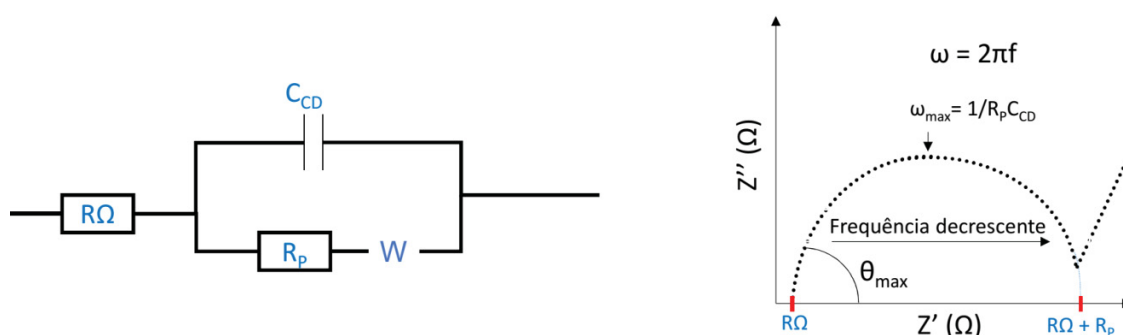
1.3.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) é uma ferramenta que permite caracterizar a interface eletrodo-solução de sistemas modificados. Impedância (Z) é o equivalente a resistência elétrica de um circuito com corrente alternada (Frequência diferente de zero) e obedece a um análogo da lei de Ohm ($R = V I^{-1}$). Em linhas gerais, a análise da impedância permite investigar processos de interface associando elementos elétricos a cada fenômeno envolvido nas camadas superficiais (efeitos resistivos e capacitivos) e compará-los a um circuito equivalente. [38]

A construção de um imunossensor se baseia na adição de diversas camadas não condutivas sobre a superfície de um eletrodo condutor, esse processo pode ser facilmente visualizado avaliando o perfil resistivo visto que cada etapa da construção leva a uma mudança no comportamento da resposta obtida. [38] A FIGURA 12 apresenta um circuito elétrico (chamado de circuito de *Randles*) que pode ser usado para representar um processo eletródico simples relacionando os efeitos capacitivos da interface (C_{cd}), resistência da solução (R_Ω), resistência à transferência eletrônica

(R_p) e efeitos difusionais envolvidos (W). Vários formatos podem ser usados para representar os dados, cada um com uma vantagem específica para revelar as características do sistema investigado. Um dos mais utilizados é o diagrama de Nyquist onde são colocados o componente imaginário da impedância (Z'') versus a componente real (Z') em cada frequência utilizada, e os efeitos resistivos são proporcionais ao raio do arco formado. [38]

FIGURA 12: CIRCUITO SIMPLES DE Randles E ILUSTRAÇÃO DO DIAGRAMA DE NYQUIST ESPERADO.



FONTE: O autor

Em um sistema ideal em altas frequências a impedância do sistema se aproxima da resistência ôhmica (R_Ω), ou resistência não compensada referente a solução entre os eletrodos de trabalho e referência, pois com elevadas frequências o capacitor elétrico envolvido (C_{CD}) atua como um condutor e não carrega nessa condição. Assim, os efeitos são associados a resistência da solução. Já, em baixas frequências, o capacitor carrega totalmente e impede a passagem de corrente elétrica nesse sentido e dessa forma “força” a corrente a circular pelo outro caminho, então a impedância se aproxima do valor combinado de dois resistores em série, R_Ω e R_p , que é a resistência a transferência de carga da interface eletrodo/solução. Em valores de frequência ainda menores, é verificada uma reta após o semi-círculo associada a difusão da espécie à superfície eletródica (resistência de Warburg). Em sistemas reais os comportamentos de outros elementos de circuito se misturam, porém, o arco formado ainda permite aproximar os modelos e calcular a resistência oferecida pelas camadas adicionais do imunossensor. [38]

Utilizando a técnica de espectroscopia de impedância eletroquímica e o diagrama de Nyquist é possível calcular a resistência adicional promovida pela

adição de diferentes camadas à superfície eletródica. Por exemplo, Braiek et al. (2012) demonstraram a construção e aplicação de um imunossensor label-free construído com Au-SAM como base para imobilização de anticorpos, e detectar a bactéria *Staphylococcus aureus*. O dispositivo se mostrou seletivo para *S. aureus*, e apresentou uma relação linear entre a resistência à transferência de elétrons e o logaritmo da concentração do antígeno em solução. [33]

Santos et al. (2016) desenvolveram um imunossensor label-free baseado em Au-MPA para detecção de *Trypanosoma cruzi*. Todo o desenvolvimento do dispositivo foi investigado utilizando a técnica de EIS. Os autores reportaram um significativo aumento na resistência a transferência de carga para etapa da construção do sensor e também na detecção do *Trypanosoma cruzi*. Ao final, o imunossensor se mostrou uma alternativa promissora para o diagnóstico qualitativo da doença de chagas em soro humano. [39] Além dos trabalhos reportados, existem diversos outros trabalhos que exploram a possibilidade de utilizar a técnica de impedância para caracterizar a superfície modificada e desenvolver um imunossensor. Uma limitação do uso da EIS é que ela não é uma técnica comum na maioria dos equipamentos comerciais, normalmente é necessário acoplar algum módulo especial ou mesmo adquirir um equipamento que já tenha essa configuração. Assim, é uma técnica promissora, mas, ainda um pouco distante para um amplo uso devido ao custo.

A detecção empregando a voltametria cíclica ou a espectroscopia de impedância eletroquímica é baseada na alteração de parâmetros eletródicos ao se modificar a superfície do imunossensor, assim, é comum o uso de alguma sonda eletroquímica com concentração fixa. Íons ferricianeto são frequentemente empregados como sonda uma vez que os processos de oxirredução ocorrem em potenciais brandos e podem ser analisados para identificar eventos como o bloqueio da superfície ou a adição de compostos que melhoram a cinética de conversão da sonda.

1.3.3 Microbalança de cristal de quartzo

Outro método que pode ser utilizado é a microbalança de cristal de quartzo (QCM), que consiste em um disco de quartzo com eletrodos de ouro galvanizados em sua superfície como mostra a FIGURA 13. O princípio de funcionamento da

microbalança é pela piezoelectricidade (efeito piezoeletrico inverso), que é uma propriedade encontrada em cristais, cerâmicas e alguns polímeros, onde a aplicação de pressão mecânica sobre o material gera um acúmulo de carga, porém como esse efeito é reversível, a aplicação de um potencial elétrico leva a uma deformação do cristal. [40]

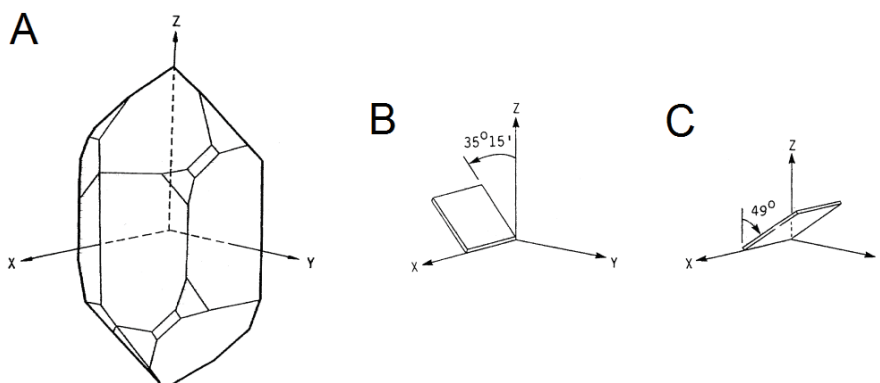
FIGURA 13: ELETRODO UTILIZADO PARA MEDIDAS DE FREQUÊNCIA POR MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.



FONTE: Manual do usuário – QCM Metrohm

Quando o potencial é aplicado de forma oscilatória, é produzido uma onda que se propaga pelo cristal perpendicular à superfície dos eletrodos na superfície do cristal. Uma variação da massa na superfície do cristal promove uma mudança na frequência de oscilação e permite relacionar a mudança de massa com a medida da frequência da onda por um contador de frequência acoplado. O corte no cristal deve ter uma orientação específica quanto aos eixos atribuídos ao cristal bruto como os cortes denominados AT e BT mostrados na FIGURA 14, uma vez que isso define a organização química e as propriedades mecânicas do disco utilizado, não apresentando desvio ou deslocamento da onda por conta da estrutura interna do cristal. [40]

FIGURA 14: ESTRUTURA DE UM CRISTAL DE QUARTZO (A) E OS CORTES AT (B) E BT (C) QUE PODEM SER USADOS NA MICROBALANÇA. [40]



FONTE: Adaptado de O'Sullivan (1999)

A variação de massa na superfície do eletrodo interfere nas propriedades mecânicas do cristal, diminuindo a frequência natural do disco de quartzo. Essa diferença de frequência é proporcional a massa depositada, e pode ser descrita pela equação de Sauerbrey (Equação 2), primeiramente desenvolvida para deposição de massa em microbalança fechada em fase gasosa de composição controlada. [41]

$$\Delta F = \frac{-2\Delta m f^2}{A\sqrt{\mu\rho_q}} = -C_f\Delta m \quad (2)$$

Onde: ΔF é a variação observada na frequência de oscilação em Hz, f^2 a frequência fundamental do cristal elevada ao quadrado, Δm a variação de massa em gramas, A a área superficial do eletrodo em cm^2 , μ o módulo de cisalhamento do quartzo ($2,947 \times 10^{11} \text{ g cm}^{-2}$), ρ_q a densidade do quartzo ($2,648 \text{ g cm}^{-3}$) e C_f a constante de sensibilidade de massa que depende do cristal usado, em $(\text{sg})^{-1}$.

Essa equação é válida quando a medida é feita em vácuo ou meio gasoso, porém para meio líquido são necessárias aproximações envolvendo a densidade do solvente utilizado. A equação também perde a validade quando a massa depositada é maior do que $100 \mu\text{g}$. Nesses casos a variação entre a massa e a frequência pode ser linear o suficiente para construção de curvas analíticas ou simples observação de tendências, mas o valor exato da massa depositada não pode ser levado em consideração. [40]

Yang et al. (2015) utilizaram um microbalança de cristal de quartzo para construir um imunossensor label-free utilizando ácido 3-mercaptopropiônico para funcionalizar a superfície do eletrodo de ouro, e através da reação com EDC/NHS para imobilizar anticorpo específico para ketamina. O reconhecimento entre o anticorpo e o antígeno gerou uma diminuição da frequência registrada para o cristal entre 15 e 45 Hz nas concentrações estudadas, e a aplicação do biossensor feita em urina, onde os interferentes não apresentaram uma variação significativa do sinal.

1.4 JUSTIFICATIVA

O trabalho presente visa suprir a necessidade de procedimentos de diagnósticos mais rápidos e com menos consumo de reagentes, ao empregar métodos eletroquímicos para avaliar a construção de um imunossensor label-free para diagnóstico de síndrome pulmonar por Hantavírus. O Hantavírus sofre mutações rapidamente, influenciado principalmente pela espécie de roedor hospedeira, por isso o desenvolvimento de procedimentos para variações locais como o Hantavírus *araucaria* é desejável.

Na literatura não há registro de imunossensores que exploram as vantagens e facilidades da configuração label-free para a detecção de anticorpos específicos para Hantavírus, apesar de em teoria ser o procedimento mais rápido e barato para determinar a ocorrência de uma infecção. Para isso, métodos bem consolidados na literatura como o uso de eletrodos de ouro e monocamadas auto-organizáveis podem ser empregados na construção de um imunossensor para substituir o método ELISA no diagnóstico de síndrome pulmonar por Hantavírus

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo Geral

Construção de um imunossensor eletroquímico label-free utilizando ouro como substrato, e a formação de uma monocamada auto-organizável para imobilização do nucleocapsídeo do Hantavírus *Araucaria*, e detecção dos anticorpos específicos pela formação do imunocomplexo.

1.5.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Preparação e pré-tratamento da superfície do eletrodo de ouro.
- b) Formação de uma monocamada auto-organizável e otimização dos parâmetros de reação.
- c) Avaliar a construção do imunossensor label-free utilizando voltametria cíclica, espectroscopia de impedância eletroquímica e microbalança de cristal de quartzo.
- d) Otimização dos parâmetros para imobilização da nucleoproteína e construção do imunossensor label-free.
- e) Avaliar a detecção utilizando diferentes concentrações de anticorpo específico para formação do imunocomplexo.
- f) Aplicar os testes de seletividade e estabilidade pertinentes para imunossensores eletroquímicos.
- g) Aplicar o imunossensor eletroquímico desenvolvido para aplicação em amostras reais fortificadas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

A nucleoproteína do Hantavírus *Araucaria* (HNp) 1,16 mg mL⁻¹, anticorpo monoclonal específico (Ab) 0,4 mg mL⁻¹, anticorpo controle (CAb) 0,16 mg mL⁻¹ e albumina de soro bovino (BSA) foram cedidas pelo Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ. Tampão fosfato salino pH 7,2 foi preparado a partir de 8,1 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄, 1,5 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄, 137 mmol L⁻¹ NaCl e 2,7 mmol L⁻¹ KCl. Tampão acetato pH 4 foi preparado a partir de CH₃COONa e ácido acético glacial. Ácido 3-mercaptopropiônico, Cloridrato de N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), N-Hidroxisuccinimida (NHS) e soro humano foram obtidos da Sigma-Aldrich. K₃Fe(CN)₆ da Vetec e álcool etílico absoluto 99,8% da NEON comercial Ltda.

2.2 ELETRODOS DE OURO E PROCEDIMENTOS PARA PREPARO DA SUPERFÍCIE

Um eletrodo de disco de ouro (0,3 mm de diâmetro) foi utilizado como eletrodo base para medidas de impedância e voltametria (FIGURA 15). A limpeza dos eletrodos de ouro é feita antes da construção do imunossensor e é composta por três etapas: a) polimento mecânico em alumina 0,3 µm; b) Imersão em etanol 96% e após seco ao ar livre; c) limpeza eletroquímica por voltametria de pulso diferencial em 0,5 mol L⁻¹ NaOH de 0 a -1,2 V, $\nu = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e 25 mV de amplitude de pulso; d) voltametria cíclica em 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ entre 0,1 e 1,6 V e $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

FIGURA 15: ELETRODO DE DISCO DE OURO UTILIZADO PARA VOLTAMETRIA E EIS.



FONTE: O autor.

Para medidas de voltametria uma configuração convencional de três eletrodos foi utilizada, com o eletrodo de disco de ouro como eletrodo de trabalho, platina metálica como contra-eletrodo e Ag/AgCl/KCl 3,0 mol L⁻¹ como eletrodo de referência. As voltametrias cíclicas foram realizadas na presença de 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} como sonda eletroquímica diluída em tampão fosfato salino pH 7,2, lido em potenciais de -0,1 a +0,6 V com uma velocidade de varredura de 150 mV s⁻¹.

As medidas de impedância foram realizadas com a mesma configuração de eletrodos e solução da voltametria, em uma faixa de frequência de 0,1 a 100 kHz com 25 mV de amplitude do sinal alternado em um potencial de circuito aberto.

Um cristal de quartzo de corte AT com superfície de ouro (0,67 mm diâmetro) e de frequência natural de 6 MHz (Metrohm) foi utilizado para as medidas de QCM.

Por causa da fragilidade do cristal e dos contatos a limpeza dos eletrodos é feita de forma diferente: a) Imersão em etanol 96% e secagem ao ar livre; b) Desorção eletroquímica pela quebra das ligações Au-S por voltametria de pulso diferencial em 0,1 mol L⁻¹ NaOH de 0 a -1,2 V, $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ e 25 mV de amplitude de pulso; d) voltametria cíclica em 0,1 mol L⁻¹ H₂SO₄ entre 0,1 e 1,6 V e $v = 25 \text{ mV s}^{-1}$.

Medidas de frequência foram realizadas em uma cela por batelada com volume interior de 3 mL e encaixe próprio para o cristal de quartzo ilustrado na FIGURA 16, com 1 mL de tampão fosfato salino pH 7,2 dentro da cela utilizada a fim de padronizar a medida, uma vez que a quantidade e propriedades do líquido acima do cristal de quartzo interfere na resposta obtida.

FIGURA 16: CONTADOR DE FREQUÊNCIA, CELA POR BATELADA E CRISTAL DE QUARTZO UTILIZADO. (ESQUERDA PARA DIREITA)



FONTE: Manual do usuário – QCM Metrohm

Potenciostato galvanostato AUTOLAB PGSTAT128N com módulo adicional de QCM e software Nova 1.11 permitiu as medidas de frequência e voltametria,

enquanto EIS foi feito em um IviumStat.XR com software próprio. Os dados foram tratados usando o software OriginPro 8.

2.3 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR

O tiol utilizado para formar a monocamada auto-organizável (SAM) e funcionalizar a superfície foi o ácido 3-mercaptopropiônico diluído em etanol 99,6% acidificado onde a concentração e o tempo de formação da monocamada foram objetivos de estudo.

Após a funcionalização da superfície a ativação dos grupos carboxílicos foi feita através da reação com EDC/NHS. Ambos reagentes foram diluídos em tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,18 e o tempo de imersão fixado em 15 minutos para evitar reações cruzadas.

A nucleoproteína do hantavírus *Araucaria* foi ligada à superfície através da imersão do eletrodo ativado em uma solução onde a concentração e o tempo de incubação também foram estudados. A nucleoproteína se liga à superfície quando um grupo nitrogenado reativo substitui as moléculas de NHS covalentemente ligadas após a ativação, porém, nem todas moléculas são substituídas, se fazendo necessário uma etapa para desativar a superfície. Para isso albumina de soro bovino foi utilizada pois é uma proteína capaz de substituir as moléculas de NHS, além de não reagir posteriormente. BSA foi utilizado com 1 mg mL⁻¹ de concentração e 30 minutos de tempo de imersão.

No final de cada etapa descrita anteriormente o eletrodo é enxaguado vigorosamente para certificar que somente moléculas fortemente ligadas permaneçam na superfície. Com todas as etapas concluídas o imunossensor está pronto para ser usado na etapa de detecção para quantificar o anticorpo específico para Hantavírus *Araucaria*.

3 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

3.1 CONSTRUÇÃO DO IMUNOSENSOR

3.1.1 Limpeza e pré-tratamento da superfície dos eletrodos de ouro

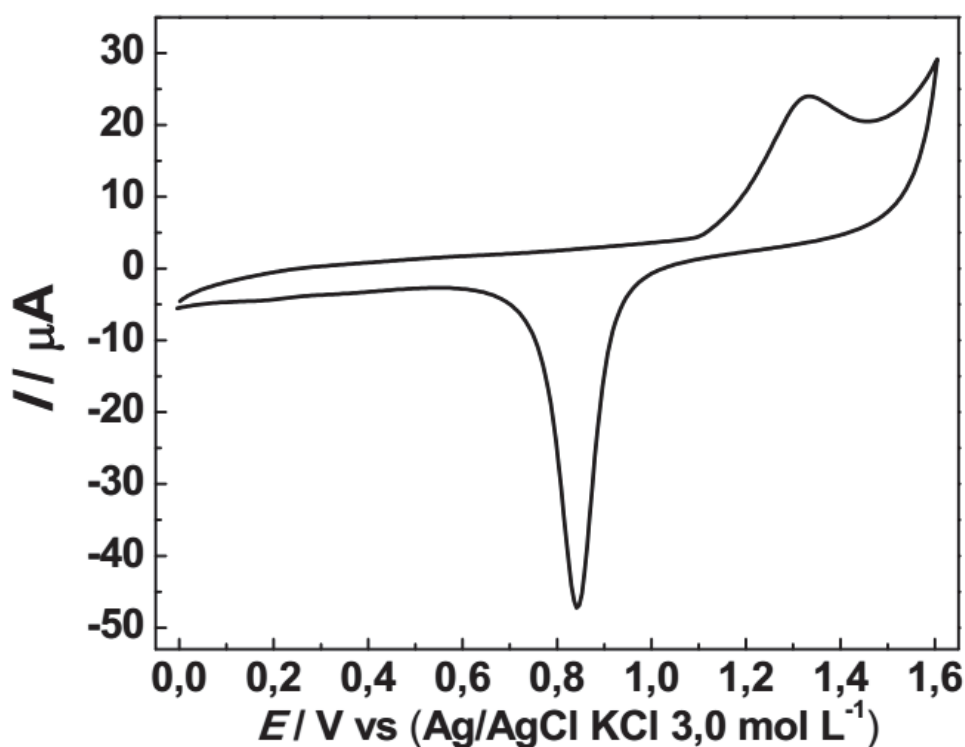
O primeiro passo para a construção do imunossensor é a limpeza e pré-tratamento do eletrodo de ouro para garantir uma superfície sem impurezas e reprodutível para a formação da monocamada. Já foi reportado em literatura por Carvalhal e col. um estudo comparativo envolvendo diferentes procedimentos de pré-tratamento para superfícies de ouro, e qual o impacto desses procedimentos na formação da monocamada auto-organizável utilizando 3-MPA. Foram avaliados pelo autor o procedimento mecânico (polimento em pó de alumina), químico (solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) e eletroquímico (voltametria de pulso diferencial em solução de NaOH) individualmente, bem como uma combinação destes métodos. A utilização dos três métodos juntos se mostrou mais efetivo e permitiu a formação de uma monocamada mais organizada. [26]

O polimento mecânico em alumina consiste em uma limpeza abrasiva para remover os componentes remanescentes na superfície no eletrodo. A limpeza eletroquímica por voltametria de pulso diferencial em solução de NaOH visa “quebrar” as ligações Au-S, que são rompidas em aproximadamente -0,9 V (vs Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹) devido a redução dos grupos tióis superficiais, e assim, são removidos resíduos da monocamada que possam estar presentes. A limpeza química utilizando solução piranha ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$) é um método destinado a remover compostos orgânicos adsorvidos e também oxida uma camada superficial do eletrodo de ouro. A limpeza mecânica e a química com solução piranha são procedimentos que não podem ser utilizados para os eletrodos utilizados da microbalança de cristal de quartzo uma vez que o cristal é frágil e pode ser quebrado facilmente no polimento mecânico. Além disso, os contatos para o equipamento (contador de frequência) não suportam o tratamento ácido. Sendo assim, para esses eletrodos, a imersão em etanol 96% apresenta-se como uma alternativa viável, a qual visa remover resíduos biológicos que permaneçam na superfície, substituindo o

tratamento químico mais agressivo por um método simples que não compromete os eletrodos da microbalança de cristal de quartzo.

Após a etapa de limpeza é importante verificar a eficiência desse procedimento. Uma das formas mais usuais para isso é obter o perfil voltamétrico do eletrodo de ouro em solução ácida uma vez que os processos eletroquímicos do ouro são bem caracterizados nessas condições. A voltametria cíclica em 0,5 mol L⁻¹ H₂SO₄ entre 0,1 e 1,6 V (vs. Ag/AgCl/KCl) é realizada para verificar os perfis de oxidação e redução do ouro. Na FIGURA 17 é mostrado um voltamograma cíclico típico para um eletrodo de ouro durante a varredura de potencial.

FIGURA 17: VOLTAMOGRAMA CÍCLICO OBTIDO APÓS O PRÉ-TRATAMENTO DO ELETRODO DE OURO, EM H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹. $\nu = 25 \text{ mV s}^{-1}$.



Do ponto de vista termodinâmico, o elemento ouro deve ser oxidado ao seu estado trivalente quando um potencial de 1,457 V (vs Ag/AgCl 3,0 mol L⁻¹) for aplicado em meio ácido, regido pela seguinte equação:



Entretanto esse processo é relatado para ouro bulk, e ouro superficial é mais ativo pois uma quantidade menor de átomos de ouro está próxima, diminuindo a estabilidade e facilitando a oxidação do elemento. Isso explica a diminuição do potencial necessário para oxidação do ouro em condições experimentais como mostrado na FIGURA 17 ($E_{pa} = \sim +1,3 \text{ V}$), e também é o motivo de eventuais desdobramentos do pico de oxidação onde ocorre a formação de AuOH através de dipolos de $\text{Au}^{\delta+}\text{OH}^{\delta-}$, que são produzidos durante a formação da monocamada de óxido e convertidos a Au_2O_3 posteriormente.

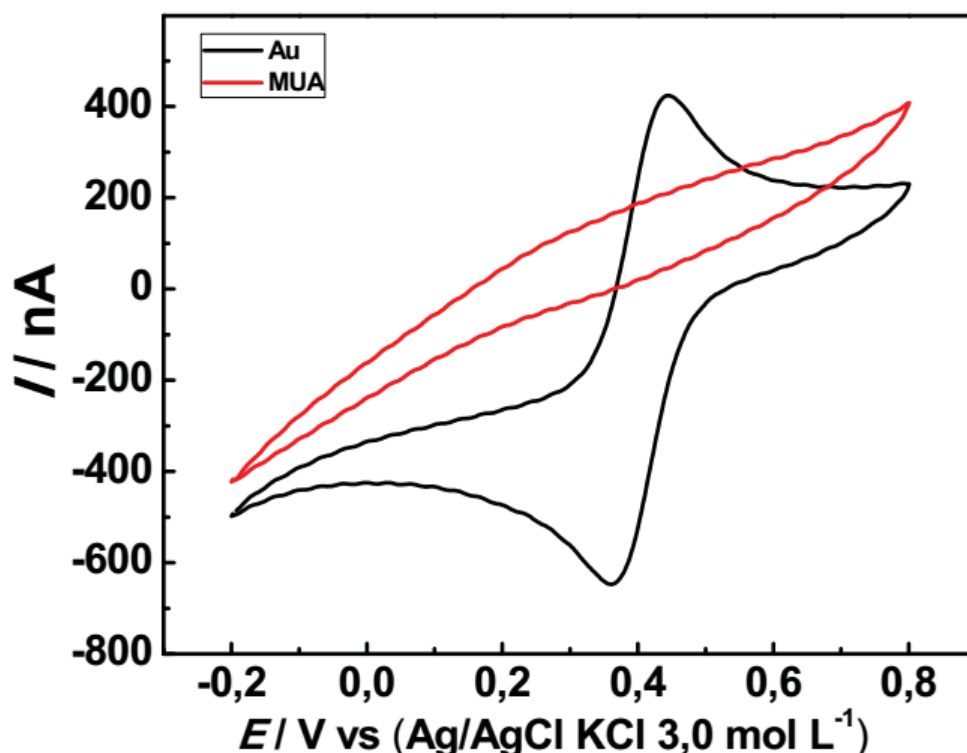
O pico catódico observado em $+0,84 \text{ V}$ é referente a redução dos óxidos formados durante a varredura anódica a ouro metálico, reorganizando a estrutura metálica da superfície. Portanto essa etapa é fundamental não só pela visualização da intensidade dos picos referentes a esses processos, mas também serve como indicativo de uma superfície livre de impurezas. Além disso, a varredura de potencial favorece a regularização da rugosidade da superfície do eletrodo através de ciclos sucessivos de oxidação/redução do ouro. A importância dessa etapa é reforçada pela formação da monocamada, onde a reprodutibilidade da superfície é o primeiro passo para a formação de uma SAM estável e semelhantemente reprodutível.

3.1.2 Formação da monocamada auto-organizável com MPA

Após a etapa de limpeza e verificação do perfil voltamétrico da superfície do eletrodo (FIGURA 17), o próximo passo na construção do imunossensor consistiu na formação da monocamada auto-organizável (SAM). A monocamada é uma forma de funcionalizar a superfície do ouro, que é pouco reativa para imobilização dos demais componentes do sensor, utilizando uma reação que acontece de forma espontânea e rápida. O tiol escolhido foi o ácido 3-mercaptopropiônico (MPA), pois o tiol de cadeia curta permite a formação da monocamada com uma menor interferência na transferência eletrônica.

Para exemplificar o bloqueio causado por tióis de cadeias maiores um estudo foi feito com o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA) e está apresentado na FIGURA 18.

FIGURA 18: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA UM ELETRODO DE FIO DE OURO ANTES E APÓS A FORMAÇÃO DA MONOCAMADA COM MUA. MUA 10 mmol L⁻¹, 10 min.

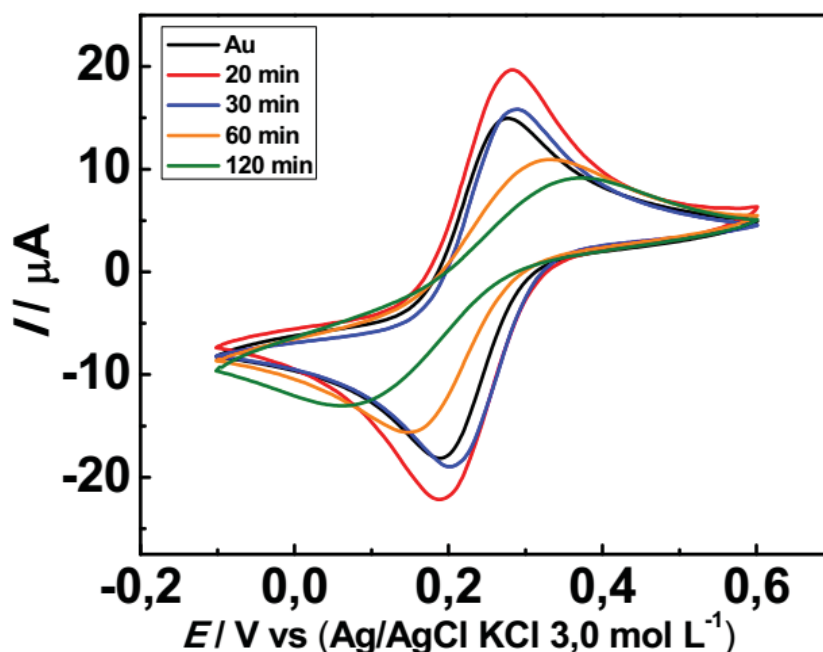


O MUA é um tiol que contém uma cadeia com 11 átomos de carbono, e uma monocamada formada em 10 minutos de reação já é suficiente para bloquear a superfície do eletrodo e evitar a conversão da sonda eletroquímica ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) em solução. Apesar de SAM formadas por tióis de cadeias mais longas formarem uma plataforma mais estável para o ancoramento de biomoléculas, esse bloqueio impossibilita a visualização das etapas posteriores para a formação do imunossensor eletroquímico, reforçando o motivo pelo qual o MPA foi utilizado no trabalho.

Dois aspectos foram investigados com relação a essa etapa da construção, o tempo de formação e a concentração do ácido 3-mercaptopropiônico. Ambos os parâmetros foram estudados por voltametria cíclica utilizando íons ferricianeto ($[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$) como sonda eletroquímica em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,2. Inicialmente, o efeito do tempo de imersão do eletrodo na solução do tiol foi avaliado entre 20 e 120 minutos em uma solução de concentração de 10 mmol L⁻¹ de MPA. A avaliação consistiu na comparação do perfil voltamétrico obtido para a sonda sobre o

eletrodo modificado e não modificado com a monocamada. Os voltamogramas cíclicos obtidos nesses estudos estão apresentados na FIGURA 19.

FIGURA 19: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA ELETRODOS DE OURO SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPOS DE FORMAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL COM SOLUÇÃO CONTENDO 10 mmol L^{-1} DE MPA. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Observando os resultados obtidos é possível verificar que o voltamograma referente ao ouro *bulk* apresenta um processo anódico com potencial de pico $E_{PA} = +0,275 \text{ V}$ e que esse valor se desloca para valores mais positivos conforme o tempo de formação da monocamada é elevado ($+0,282 \text{ V}$; $+0,289 \text{ V}$; $+0,330 \text{ V}$; $+0,375 \text{ V}$). Isso indica uma dificuldade dos íons ferricianeto em se aproximar da superfície do eletrodo, à medida que as monocamadas se tornam mais organizadas. Esse efeito corrobora com o aumento da energia necessária (potencial) para promover o processo anódico.

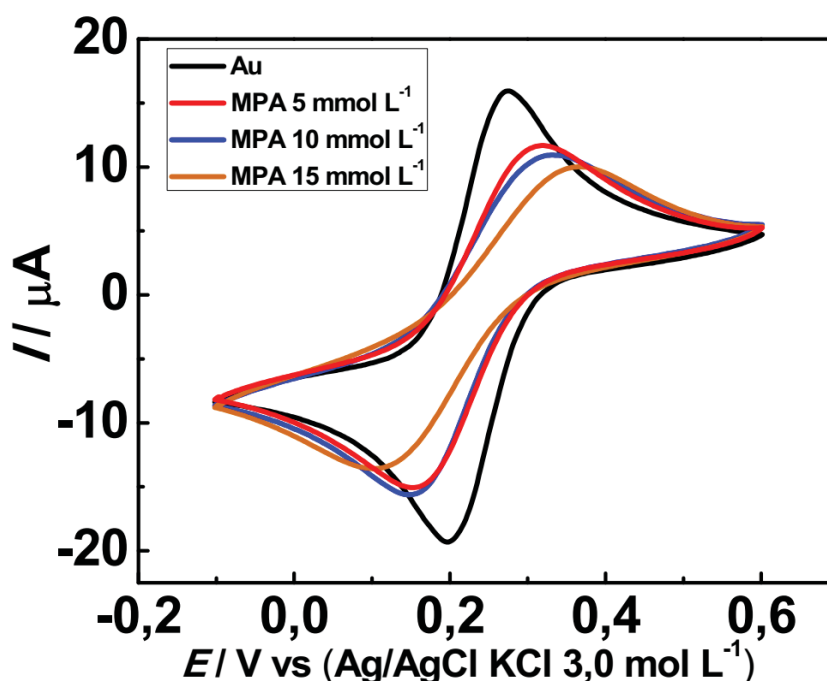
Além da variação dos potenciais de pico, a taxa de conversão (corrente de pico) também diminui, sendo esta diminuição proporcional ao tempo de formação e organização das camadas, o qual pode ser verificado pela intensidade dos picos anódicos. Verifica-se que maiores tempos de formação da monocamada geram menores correntes de pico, porém tempos menores de 30 minutos levaram a um aumento na corrente de pico em relação ao eletrodo sem modificação. [43] Esses resultados observados na FIGURA 19 são explicados ao se considerar que são superfícies parcialmente cobertas, e a resposta eletroquímica pode ser maior que a

do eletrodo bulk dependendo dos defeitos superficiais, solventes enclausurados e a velocidade de varredura utilizada. [43] A presença dessas características pode afetar a difusão da sonda eletroquímica e acabar concentrando a espécie convertida na superfície do eletrodo, mascarando o pequeno bloqueio causado uma vez que o sinal observado é maior do que o esperado. [44]

Considerando os efeitos sobre a resposta voltamétrica (corrente e potencial de pico) é possível concluir que um tempo de formação maior que 30 minutos deve ser empregado para a formação da monocamada, pois levam a formação de uma monocamada com menos defeitos e mais organizada, como pode ser verificado através das medidas de voltametria cíclica apresentadas. [45] Visando uma estabilidade mínima, o tempo de formação da monocamada de 60 minutos foi adotado para avaliar o efeito da concentração. O tempo de 120 minutos foi desconsiderado por aumentar o tempo de construção do eletrodo e oferecer uma diminuição significativa do sinal dos íons ferricianeto, podendo interferir com os passos seguintes uma vez que a atenuação do sinal é o parâmetro considerado na etapa de detecção.

A concentração da solução de tiol utilizada também exerce um papel importante na formação da monocamada. Na FIGURA 20 estão apresentados os resultados obtidos para eletrodos de ouro construídos com monocamadas preparadas com concentrações variadas entre 5 e 15 mmol L⁻¹ de ácido 3-mercaptopropiônico.

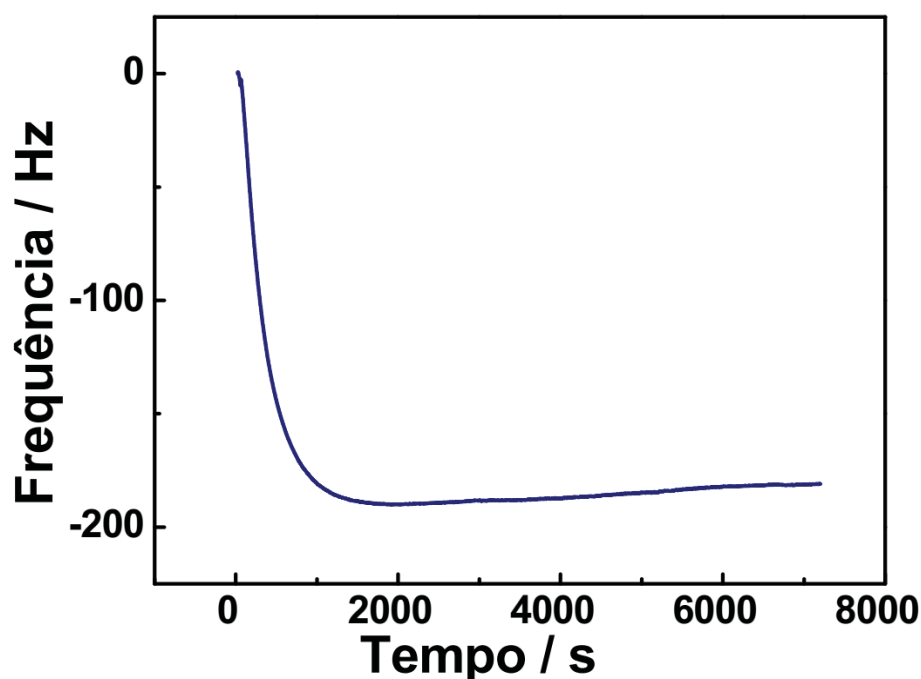
FIGURA 20: VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA OS ELETRODOS DE OURO APÓS 1 HORA DE FORMAÇÃO DA MONOCAMADA AUTO-ORGANIZÁVEL EM SOLUÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MPA. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



Com base nos resultados é possível verificar que o efeito da concentração de MPA exerce uma influência semelhante ao tempo de imersão. Os valores de corrente de pico observados são inversamente proporcionais à concentração utilizada para formar a monocamada, sugerindo um maior recobrimento quando soluções de tiol mais concentradas foram utilizadas.

É reportado em literatura que a formação da SAM se dá em duas etapas, uma etapa rápida relacionada a ligação Au-S e uma etapa lenta referente a organização espontânea da camada. [45] O uso de uma solução mais concentrada interfere na etapa rápida, pois aumenta a possibilidade da ligação espontânea entre o tiol e o ouro, mas não necessariamente aumenta a velocidade com que a camada se organiza e fica mais estável. Um estudo para investigar a formação da monocamada foi feito com o auxílio da microbalança de quartzo para avaliar o tempo necessário para que a etapa rápida da formação da camada seja considerada completa, através da variação de massa causada pela ligação do tiol. A FIGURA 21 apresenta a variação da frequência do cristal de quartzo durante a formação da SAM.

FIGURA 21: VARIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DURANTE A FORMAÇÃO DA MONOCAMADA EM UMA MICROBALANÇA DE CRISTAL DE QUARTZO.



O resultado apresentado na FIGURA 21 mostra que a frequência de oscilação do cristal de quartzo diminui consideravelmente nos 1000 primeiros segundos de reação. Isso indica que há um aumento de massa na superfície devido a formação da ligação do enxofre-ouro. É possível concluir que esse é o tempo necessário para que a etapa rápida se complete, portanto, a maioria da superfície está funcionalizada e qualquer tempo além desse pode ser considerado como a etapa organizacional da monocamada.

Idealmente a monocamada deveria estar totalmente organizada, pois melhora a estabilidade e reprodutibilidade da SAM, porém isso pode levar a um maior tempo para a detecção e bloquear o sinal eletroquímico. Com base nesses aspectos, um valor intermediário deve ser considerado desde que não comprometa a estabilidade da construção do imunossensor. Considerando os resultados obtidos no estudo de tempo e concentração por voltametria, e o acompanhamento da formação da monocamada com microbalança de cristal de quartzo, foram escolhidos como parâmetros adequados: 1 hora como o tempo de formação da monocamada e concentração de 15 mmol L⁻¹ de MPA por favorecer a etapa rápida.

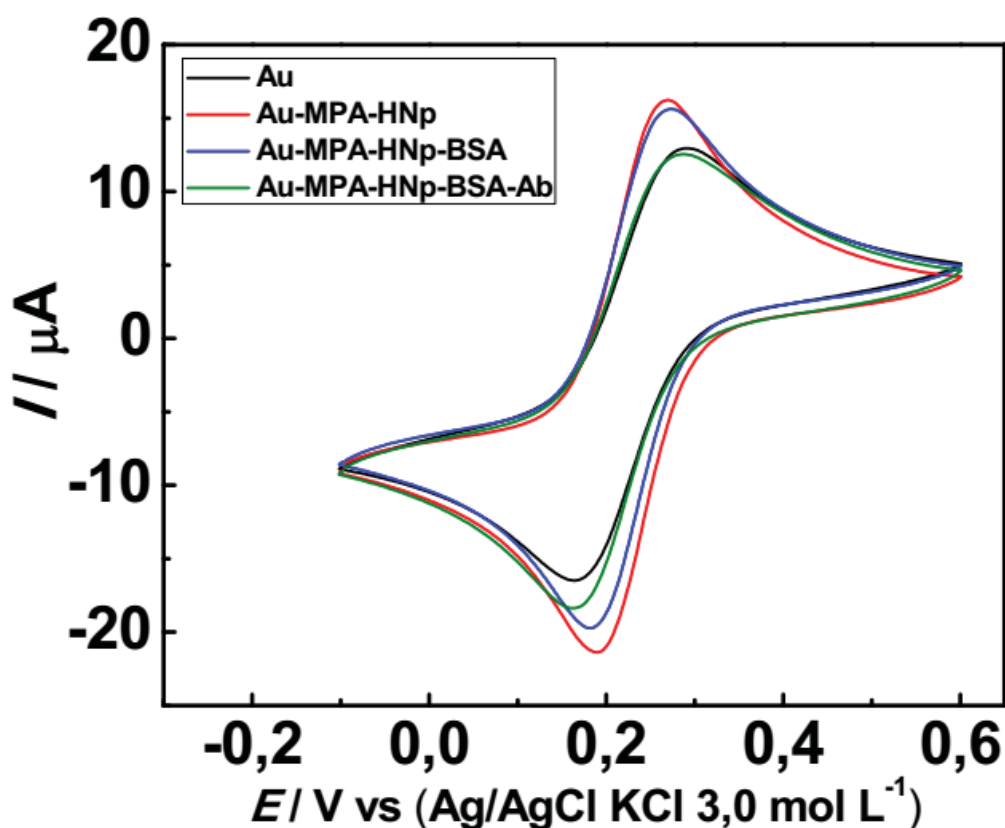
3.1.3 Construção do imunossensor e detecção

Depois de realizada a etapa de formação das SAM, a nucleoproteína (HNp) foi ligada covalentemente à superfície pela reação com EDC/NHS. Além desses reagentes, os outros componentes (albumina de soro bovino (BSA) e o Anticorpo (Ab)) foram adicionados à superfície do imunossensor visando atingir a configuração final proposta.

A albumina de soro bovino (BSA) é uma proteína solúvel em água que é usada para substituir as moléculas de NHS que não foram substituídas pela HNp e ainda estão na superfície. Esse passo é importante por que esses sítios presentes na superfície podem ser substituídos pelo anticorpo na etapa seguinte gerando uma resposta não adequada. Bloquear os sítios superficiais com BSA garante que a única forma do anticorpo se ligar à superfície seja pela formação do imunocomplexo com a HNp. Isso melhora a seletividade da resposta do dispositivo, pois moléculas que são incapazes de se ligar à nucleoproteína não irão interferir no sinal em qualquer uma das técnicas utilizadas, diminuindo a quantidade de interações inespecíficas que ocorrem na etapa de detecção. [46]

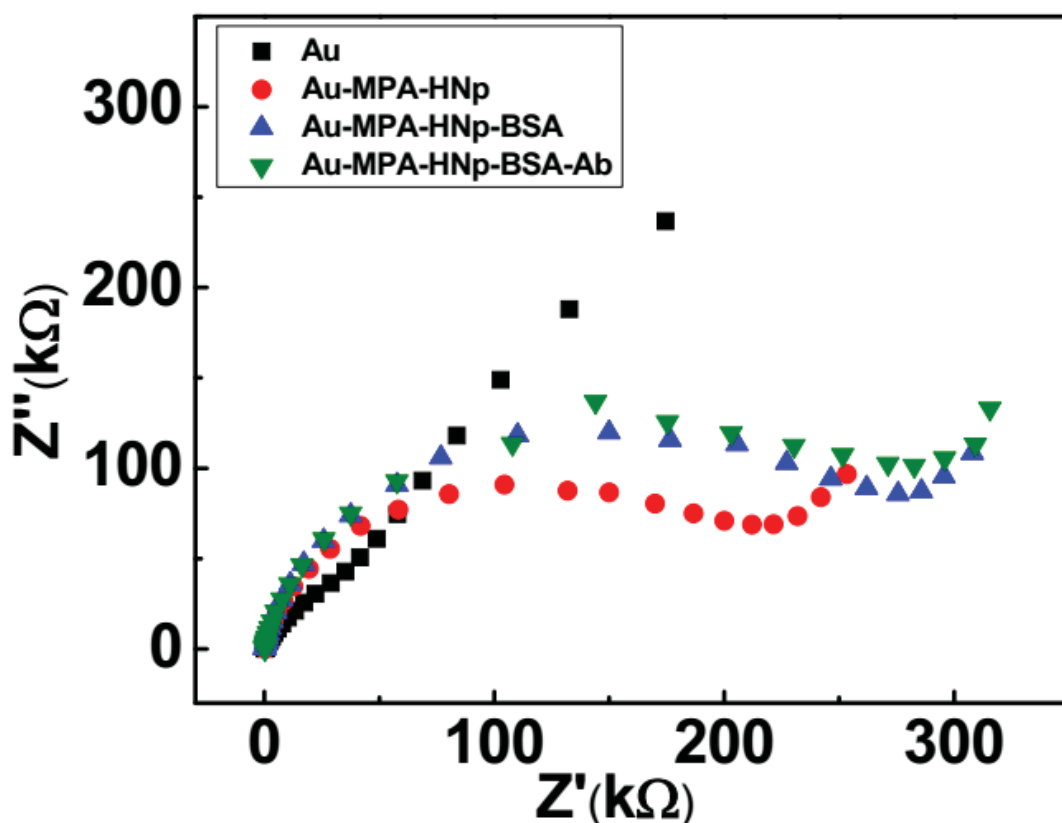
Cada etapa envolvida na construção do imunossensor foi avaliada utilizando voltametria cíclica (CV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e a microbalança de cristal de quartzo (QCM). As medidas foram realizadas após a conclusão de cada etapa e o comportamento observado para os eletrodos modificados pode ser observado nas FIGURA 22, 23 e 24.

FIGURA 22: MEDIDAS DE VOLTAMETRIA CÍCLICA APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.



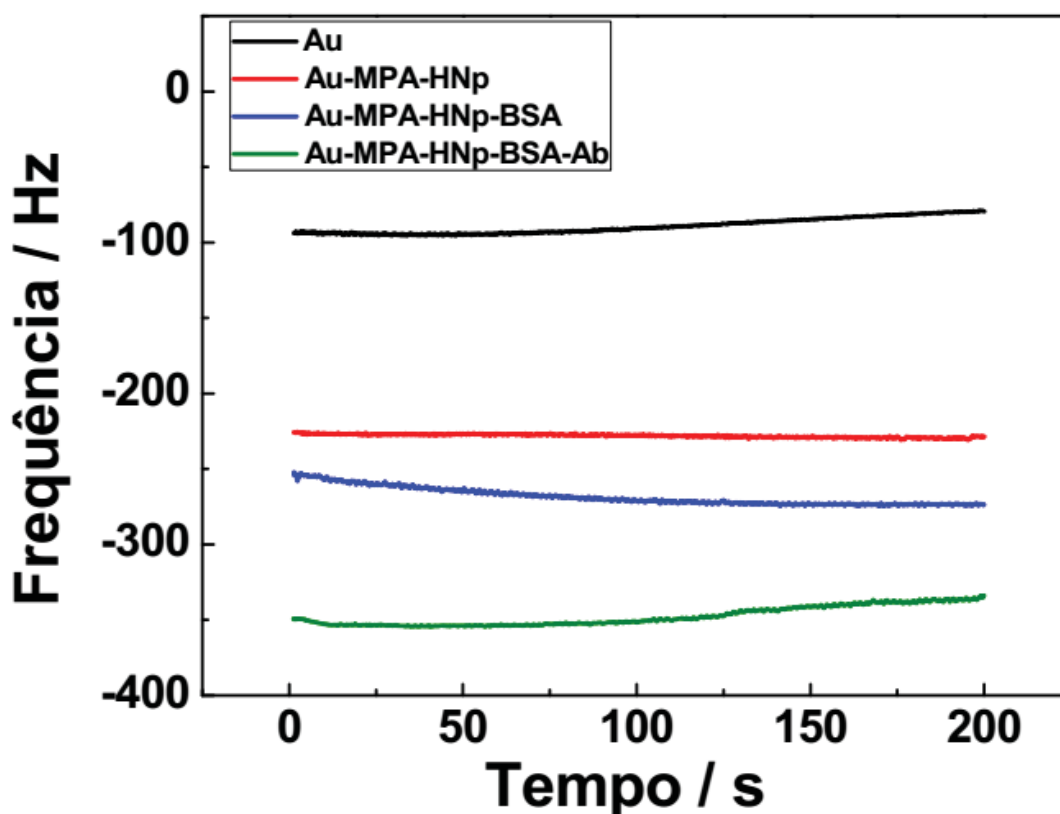
Os voltamogramas cíclicos mostram que há um aumento na corrente de pico da sonda eletroquímica após a fixação da nucleoproteína do Hantavirus quando comparado tanto ao eletrodo bulk como ao eletrodo recoberto pela SAM mostrado anteriormente (FIGURA 22). Assim, foi verificada que a etapa de ativação ou a fixação da biomolécula aumentaram a resposta voltamétrica do biossensor. Esse mesmo efeito foi observado por Pauliukaite *et al.*, onde a superfície tratada com EDC e NHS forneceu uma resposta voltamétrica 3 vezes maior que outros agentes de ligação. [47] Portanto, o aumento de corrente observado pode ser atribuído às moléculas de NHS que não foram substituídas na etapa de imobilização da nucleoproteína. Além da voltametria cíclica, a EIS foi avaliada para verificar o efeito das camadas na resistência a transferência de carga entre a superfície modificada e a sonda em solução. Os resultados estão apresentados na FIGURA 23.

FIGURA 23: MEDIDAS DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.



Analisando os diagramas de Nyquist (FIGURA 23) obtidos para os eletrodos construídos com as mesmas etapas mostradas anteriormente é possível verificar uma diferença no comportamento do eletrodo bulk (onde há uma maior contribuição da constante de Warburg evidenciado pela reta de aproximadamente 45° após o pequeno semicírculo formado) com relação ao comportamento observado para o eletrodo com a nucleoproteína. É possível verificar que o raio do semicírculo formado é muito mais evidente devido a camada resistiva adicionada sobre a superfície. A resistência a transferência de carga do eletrodo sem modificação foi calculada como 47 kΩ enquanto para eletrodo com a SAM e o antígeno imobilizado o valor subiu para 215 kΩ, indicando uma grande diferença na resistividade do eletrodo mesmo apresentando um sinal voltamétrico maior. De forma semelhante, as etapas envolvidas na construção foram investigadas por EQMC e as variações de frequência observadas estão apresentadas na FIGURA 24.

FIGURA 24: MEDIDAS DE FREQUÊNCIA (C) APÓS CONCLUSÃO DE CADA ETAPA ENVOLVIDA NA CONSTRUÇÃO DO IMUNOSSENSOR PROPOSTO. MPA: ÁCIDO 3-MERCAPTOPROPIÔNICO; HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.



Os resultados EQCM mostram que há um deslocamento negativo na frequência de oscilação de 140 Hz o que indica uma deposição de massa na superfície do eletrodo comprovando a deposição da SAM e da ligação da nucleoproteína à superfície funcionalizada. A etapa de bloqueio dos sítios inespecíficos utilizando BSA causou uma alteração -40 Hz na frequência do cristal de quartzo, um valor menor é esperado, uma vez que se trata de uma reação de substituição entre duas moléculas pequenas.

Combinando os resultados obtidos pelas técnicas empregadas, a resistência à transferência de elétrons para o eletrodo contendo BSA mostrou um valor de 269 k Ω , causado pela adição de uma proteína de caráter resistivo na superfície do eletrodo. A voltametria cíclica para a mesma etapa deveria apresentar uma diminuição considerável do sinal voltamétrico, porém o valor de corrente de pico ainda é alto mesmo após a substituição das moléculas de NHS restantes, o que

pode ser atribuído ao aumento de falhas e espaços criados pela presença de grandes biomoléculas na superfície, que podem desorganizar a monocamada ou remover algumas partículas, aumentando a superfície ativa para conversão da sonda eletroquímica.

Por fim, na etapa de detecção há uma diminuição considerável na corrente de pico do par redox devido à grande quantidade de interações específicas entre o antígeno imobilizado e os anticorpos que se ligaram aos sítios antigênicos durante a incubação. Na frequência houve uma diminuição de 80 Hz, e um aumento da R_{et} para 283 k Ω , uma diferença pequena provavelmente pelo fato do anticorpo se ligar à nucleoproteína, que já está em uma parte resistiva do eletrodo, diminuindo o efeito das interações sobre a resistência total do dispositivo. Isso confirma a viabilidade de construção de um imunossensor simples, e o uso de três técnicas para monitorar todas as etapas necessárias para detectar a presença de anticorpos específicos em solução.

Os resultados comprovam que qualquer uma das técnicas, em princípio, poderia ser empregada tanto para acompanhar a construção como na detecção do analito. Porém, é importante reforçar que a EIS e a EQCM são técnicas que necessitam de módulos e eletrodos especiais que limitam um pouco seu uso e consequentemente, sua aplicação. Assim, a voltametria cíclica é a ferramenta mais adequada para avaliar a etapa de detecção do imunossensor.

3.2 AVALIAÇÃO DAS ETAPAS ENVOLVIDAS NA CONSTRUÇÃO

Antes de investigar o desempenho analítico do imunossensor desenvolvido, as condições experimentais de cada etapa foram estudadas a fim de melhorar as características do dispositivo, como estabilidade e sensibilidade. Os parâmetros foram estudados e os melhores resultados foram obtidos analisando principalmente o tempo de reação e a concentração das soluções usadas na construção do imunossensor. Dessa forma, o procedimento foi avaliado visando propor uma estratégia que possa ser mais fácil, eficiente e reduza o gasto de tempo/material. Todos os estudos foram feitos utilizando voltametria cíclica por ser uma técnica acessível com maior facilidade e disponibilidade dos equipamentos presentes no laboratório do grupo LabSense.

O tempo de ativação do EDC/NHS não foi investigado uma vez que tempos longos de reação podem levar a reações cruzadas entre essas espécies e não promover adequadamente a ativação dos grupos carboxílicos do alcanotiol presente na superfície do eletrodo. Assim, o tempo de reação de 15 minutos foi fixado para todas as ativações de superfície e a concentração de ambos EDC e NHS foi variada entre 5 e 20 mmol L⁻¹. Considerando todas as etapas, desde a ativação até a detecção do anticorpo, não foi notada diferença significativa na imobilização em função da concentração utilizada, e dessa forma, a menor concentração foi considerada adequada para as próximas construções.

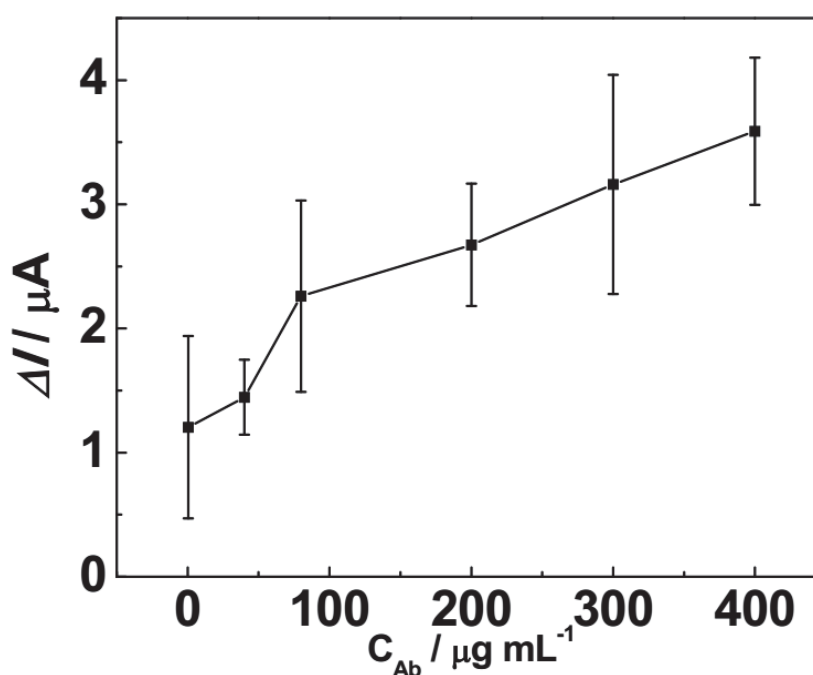
A quantidade de nucleoproteína imobilizada na superfície do eletrodo é um dos parâmetros importantes que regula a sensibilidade do imunossensor, portanto a concentração da solução foi estudada de 1,19 mg mL⁻¹ (solução estoque) a 1,19 ng mL⁻¹. Após a imobilização da nucleoproteína foi realizada uma medida de voltametria cíclica na presença de íons ferricianeto sendo observados valores de correntes de pico muito próximas para todas concentrações. Assim, para avaliar a melhor concentração de nucleoproteína foi observado a diferença entre as correntes antes e após o bloqueio com BSA, pois uma maior diferença entre os sinais significa que menos antígeno foi imobilizado na superfície. Como esperado, menores concentrações de antígeno resultaram em uma maior diferença para a etapa de bloqueio, sendo que a menor concentração que apresentou uma diferença no sinal foi 1,19 µg mL⁻¹. Esta concentração de HNp foi escolhida como otimizada pois é menor que a concentração estoque, mas oferece a mesma efetividade na substituição das moléculas de NHS, evitando a perda de material biológico. O tempo de reação para a imobilização da nucleoproteína foi variado entre 10 e 120 min, sendo que dispositivos construídos com tempos de até 20 minutos não apresentaram sinal na etapa de detecção devido ao pouco tempo de reação. Portanto, os valores foram fixados em 1,19 µg mL⁻¹ e 30 min de imersão.

A concentração da albumina foi modificada para verificar o efeito sobre a etapa de detecção, mas o sinal obtido para a mesma concentração de anticorpo foi a mesma para todas as concentrações de BSA. Consequentemente a concentração de 1 mg mL⁻¹ e 30 min de reação foram fixados. Todos os parâmetros estudados e valores otimizados estão resumidos na TABELA 1.

TABELA 1: CONDIÇÕES AVALIADAS E OS MELHORES VALORES OBTIDOS.

Etapa	Parâmetro	Valores estudados	Valores otimizados
EDC/NHS	Tempo	-	15 min
	Concentração	5 a 20 mmol L ⁻¹	5 mmol L ⁻¹
HNp	Tempo	10 a 120 min	30 min
	Concentração	1,19 mg mL ⁻¹ a 1,19 ng mL ⁻¹	1,19 µg mL ⁻¹
BSA	Tempo	-	30 min
	Concentração	1 a 5 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹

O desempenho analítico do dispositivo foi verificado variando a concentração de anticorpo a ser detectado em uma faixa de concentração entre 0,4 e 400 mg mL⁻¹ (solução estoque) e um tempo de imersão de 30 minutos. Para cada concentração estudada um dispositivo novo era construído desde a formação da SAM, realizando medidas de voltametria cíclica em solução contendo íons ferricianeto antes e após a incubação para cada concentração de anticorpo. A variação na corrente de pico para cada adição realizada foi empregada e o decréscimo nesse sinal devido a formação do imunocomplexo pareado com a concentração de anticorpo utilizada, como mostrado na FIGURA 25.

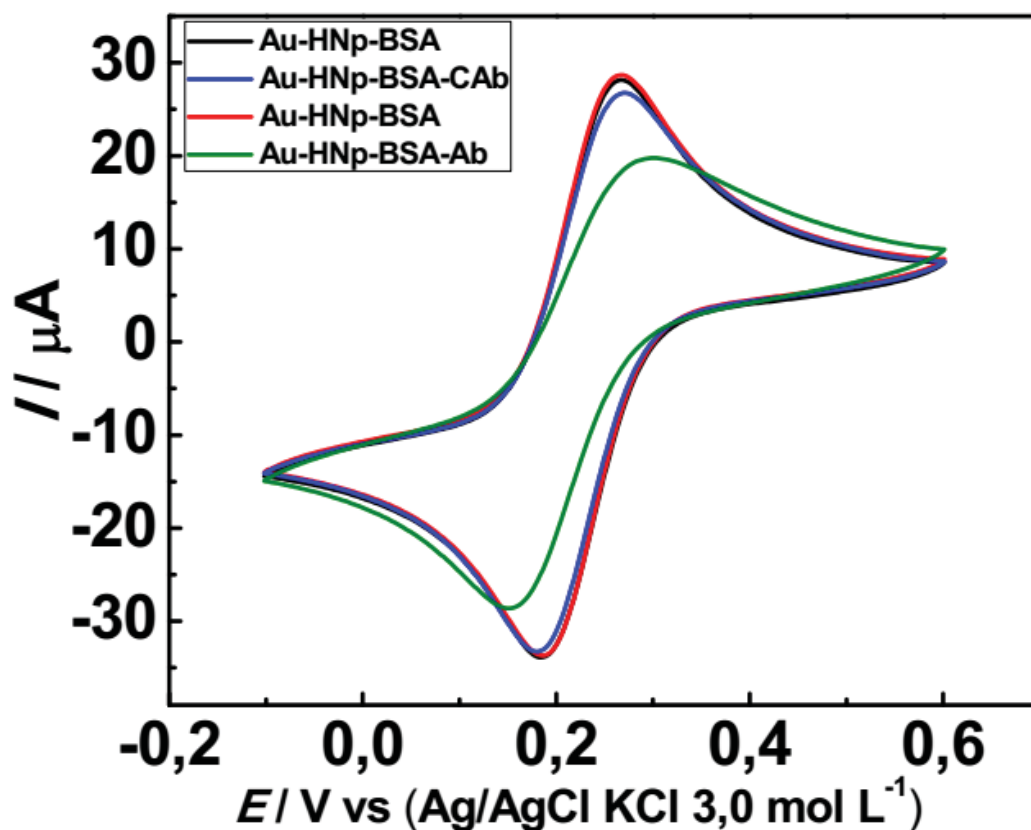
FIGURA 25: CURVA DE CALIBRAÇÃO OBTIDA PARA DETECÇÃO DO ANTICORPO ESPECÍFICO PARA HANTAVÍRUS *Araucaria*.

A curva de calibração mostrou uma tendência de decréscimo do sinal voltamétrico para maiores concentração de anticorpo resultando em uma regressão de equação $Y (I, \mu A) = 1,28 + 6,141 \times 10^{-3} X (CAb, mg mL^{-1})$ com um $R^2 = 0,956$. O desempenho analítico do imunossensor mostrou uma dificuldade na aplicação do dispositivo para quantificação de anticorpo, uma vez que o procedimento não mostrou uma reprodutibilidade boa para uma mesma concentração de IgG. Esse problema é uma influência da necessidade de se construir um imunossensor para cada medida, que fornece uma variação para cada etapa de construção e diminui a reprodutibilidade da superfície. Para contornar esse problema o biossensor pode ser utilizado de maneira qualitativa adotando um valor de referência para a diminuição do sinal.

3.3 TESTE DE SELETIVIDADE E ESTABILIDADE

A seletividade é o fator mais importante para avaliar a viabilidade de um imunossensor. Para testar a especificidade da resposta do dispositivo construído, o eletrodo foi utilizado para detecção de um anticorpo controle (CAb) o qual possui uma estrutura similar ao anticorpo específico (Ab) para a nucleoproteína do Hantavírus *Araucaria*, exceto pelo epítipo. Ambos anticorpos foram utilizados em concentração $0,16 \mu g mL^{-1}$ (concentração estoque do anticorpo controle) e o tempo de imersão de 30 minutos. Na FIGURA 26 estão apresentados os voltamogramas cíclicos relativos a esses estudos.

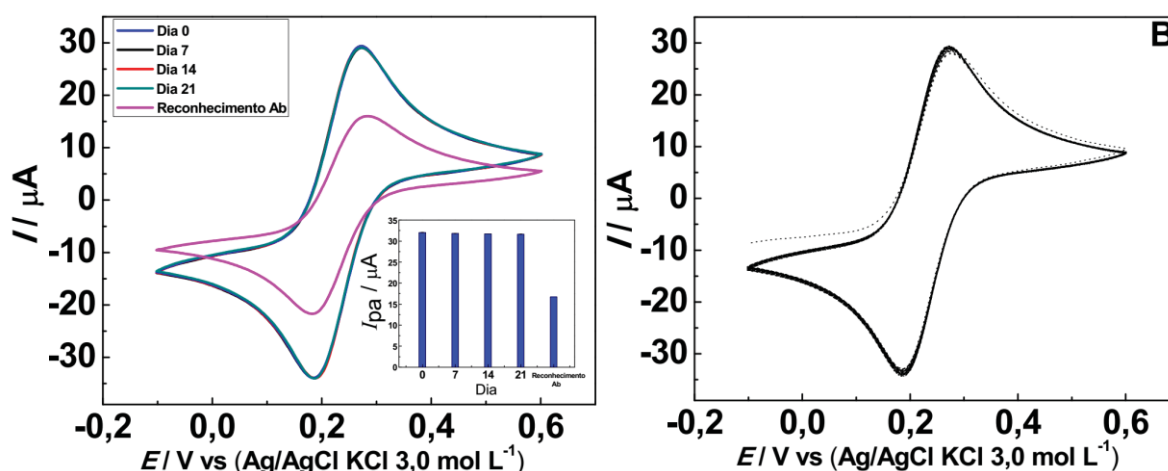
FIGURA 26: PARES DE VOLTAMOGRAMAS ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM ANTICORPO CONTROLE (CAb) (-/-) E ANTICORPO ESPECÍFICO (Ab) (-/-). HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO; CAb: ANTICORPO CONTROLE.



Os resultados apresentados na FIGURA 26 evidenciam que existe uma menor perda de sinal do voltamograma (corrente de pico) causado pelo anticorpo controle quando comparado ao voltamograma obtido na presença do anticorpo monoclonal específico. O valor na redução na corrente de pico obtida após a incubação com o anticorpo controle foi de 4,5% do valor de corrente de pico da etapa anterior, enquanto o anticorpo específico reduz 36,7% do sinal. Isso significa que a maioria dos sítios antigênicos disponíveis após o bloqueio com BSA são os que o corpo cria os IgG para combater, portanto, são sítios que tem uma afinidade para os anticorpos específicos. Esse valor indica uma boa seletividade do imunossensor, que pode ser atribuído à interação específica entre o IgG e os sítios antigênicos da nucleoproteína, pois o anticorpo com reconhecimento específico à Hantavirus gerou uma variação de sinal consideravelmente maior que o anticorpo controle nas mesmas condições de trabalho. [39]

A estabilidade do imunossensor foi testada pela verificação da corrente de pico do dispositivo montado até o bloqueio com albumina, etapa anterior à etapa de detecção, a cada 7 dias de um total de 21 dias armazenado em PBS pH 7,2 à 5° C. Além disso, no final desse período o dispositivo reservado foi utilizado para detectar o anticorpo específico ($0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$) a fim de verificar qualquer impacto causado pelo armazenamento do biossensor. A estabilidade eletroquímica também foi testada utilizando a voltametria cíclica durante uma alta quantidade de ciclos (40 ciclos) no mesmo potencial usado em medidas convencionais para verificar qualquer processo adsorptivo ou desorptivo. Os resultados obtidos estão ilustrados na FIGURA 27A e B.

FIGURA 27: A) VOLTAMOGRAMAS DO IMUNOSSENSOR PRONTO A CADA 7 DIAS E OS VALORES DE CORRENTE DE PICO OBTIDAS (INSERIDO); B) VOLTAMETRIA CÍCLICA (40 CICLOS) PARA AVALIAR A ESTABILIDADE ELETROQUÍMICA.



É possível observar que os voltamogramas obtidos a cada 7 dias de armazenamento (FIGURA 27A) sofreram pouca variação, apresentando uma perda de sinal de 6% devido ao impacto do tempo em que o eletrodo foi reservado. Foi possível a aplicação do imunossensor guardado após os 21 dias, apresentando um sinal de valor similar às detecções anteriores (testes de estabilidade e curva analítica). Isso indica que o eletrodo não perdeu sua aplicabilidade após o período armazenado, e que a estabilidade não foi prejudicada ao se priorizar tempos menores para a formação da monocamada e incubações posteriores.

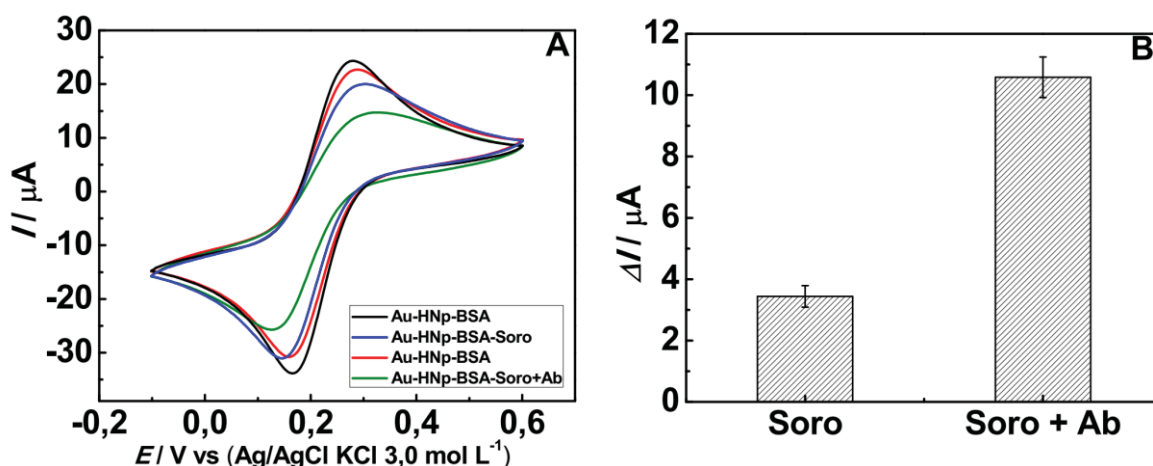
A estabilidade eletroquímica (FIGURA 27B) também mostrou bons resultados pois o sinal após os 40 ciclos não apresentou uma mudança significativa, indicando

que a varredura eletroquímica não promove a adsorção ou desorção de nenhuma espécie na superfície do eletrodo.

3.4 APLICAÇÃO DO IMUNOSSENSOR EM AMOSTRA REAL

A aplicação do imunossensor foi feita utilizando soro humano, que é composto de uma grande quantidade de proteínas presente no sangue, sendo que a principal e com maior chance de interferir na resposta a hemoglobina (IgM; $20 \mu\text{g mL}^{-1}$). O soro foi utilizado com diluição (1 volume do soro em 100 volumes finais) em testes de amostras reais e enriquecidas. O eletrodo foi incubado com o soro diluído e soro fortificado com IgG específico ($0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), e as medidas de voltametria cíclica na presença de íons ferricianeto feitas antes e depois de 30 minutos de incubação. O voltamograma com um dos resultados e o gráfico de barras com a diferença dos sinais de triplicatas estão ilustrados na FIGURA 28.

FIGURA 28: A) VOLTAMETRIA CÍCLICAS OBTIDAS ANTES E DEPOIS DA INCUBAÇÃO COM SORO E SORO FORTIFICADO; $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ EM PBS pH 7,2. B) DIFERENÇA DE CORRENTE DE PICO ANÓDICO PARA INCUBAÇÕES COM SORO E SORO FORTIFICADO ($n = 3$) SORO DILUÍDO; $C_{\text{Ab}} = 100 \mu\text{g mL}^{-1}$. HNp: NUCLEOPROTEÍNA DO HANTAVÍRUS *Araucaria*; BSA: ALBUMINA DE SORO BOVINO; Ab: ANTICORPO ESPECÍFICO.



Como pode ser observado na FIGURA 28, há uma maior diferença entre os sinais quando o soro fortificado com anticorpo específico é utilizado, o que pode ser atribuído às interações específicas entre anticorpo e a nucleoproteína. Essas interações específicas que ocorrem aumentam o bloqueio na superfície do eletrodo

e geram a variação do sinal referente a sonda. O sinal obtido somente para o soro é proporcionado pela interação de anticorpos inespecíficos e interferentes com o antígeno.

A quantidade de sítios antigênicos e as interações dependem das características do antígeno. A nucleoproteína do Hantavírus oferece uma diferença significativa entre o sinal do soro para o soro fortificado devido a quantidade de sítios específicos, permitindo a aplicação do imunossensor para uma detecção qualitativa. Isso por que, por mais que a detecção não seja quantitativa, o sinal obtido para amostras positivas se mostra regularmente maior do que o sinal dos interferentes.

Sendo assim, um valor de corte pode ser estipulado, e quando o sinal obtido é acima desse valor a amostra pode ser considerada positiva, uma vez que para ultrapassar o valor de corte é necessário a contribuição de interações antígeno-anticorpo específicas. Os sinais obtidos para o soro resumidos na FIGURA 28B tem uma média de 3,43 μA , que foram uma redução de uma corrente de pico inicial média de 23,54 μA , ou seja, 15% de redução do sinal. Já para a incubação do soro junto com o anticorpo específico ocorre uma redução de 45% no valor do sinal.

Considerando a variação intrínseca da construção do imunossensor, um valor de corte de 25% de diminuição da corrente de pico pode ser utilizado para declarar uma amostra positiva ou negativa, pois é um valor que dificilmente será ultrapassado por amostras negativas. Dessa forma, o imunossensor proposto pode ser aplicado no diagnóstico qualitativo de síndrome pulmonar por Hantavírus, utilizando o soro humano como amostra real. Essa possibilidade já foi explorada em outro biossensor com a mesma base para construção (Au-MPA) para detectar doença de chagas, também permitindo um diagnóstico qualitativo.[39]

A concentração exata de anticorpo específico no sangue quando uma pessoa está infectada não tem um valor exato, porém, espera-se que a diferença entre as amostras reais positivas e negativas seja significativa, devido a boa seletividade do imunossensor label-free desenvolvido.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, foi explorado uma aproximação simples para o desenvolvimento de um imunossensor label-free, a fim de detectar a presença de

anticorpos específicos para Hantavírus em amostras fortificadas, e potencialmente substituir o método ELISA padrão utilizado para diagnóstico.

O imunossensor eletroquímico foi construído através de uma monocamada auto-organizável para funcionalizar uma superfície de ouro, e imobilizar a nucleoproteína do Hantavírus *Araucaria* ao eletrodo através da reação com EDC/NHS, sendo obtido um sensor estável e seletivo. A configuração utilizada é a mais simples para a detecção de uma patologia regional, pois os métodos eletroquímicos fornecem informações a cada passo da construção do imunossensor, permitindo o desenvolvimento de um dispositivo label-free, sendo o primeiro nessa configuração para a determinação de Hantavírus.

O imunossensor mostrou uma boa seletividade frente ao anticorpo controle utilizado, e para a aplicação em amostras reais foi necessário o uso de um valor de corte para declarar um resultado positivo/negativo, aproximação já utilizada em um imunossensor com estrutura semelhante devido a dificuldade de se utilizar o dispositivo para quantificação de anticorpos específicos

Por fim, os objetivos do trabalho foram cumpridos ao se desenvolver um imunossensor eletroquímico label-free para diagnóstico de síndrome pulmonar por Hantavírus.

4.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A aplicação de qualquer imunossensor como método de diagnóstico depende da confiabilidade da resposta. Os testes realizados aqui confirmam a viabilidade do método utilizado para a construção do imunossensor eletroquímico label-free para diagnóstico de síndrome pulmonar por hantavírus, mas a aplicação do dispositivo ainda depende de um estudo em amostras reais, positivas e negativas, para se obter uma estatística significativa da eficiência do imunossensor na diferenciação dos resultados.

REFERÊNCIAS

- [1] ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; et al. **Alberts - Molecular Biology Of The Cell 4th Ed.** 2002.
- [2] EARN, D.J.D.; DUSHOFF, J.; et al. Ecology and Evolution of the flu. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 17, n. 7, p. 334–340, 2002.
- [3] SCHMALJOHN, C. Hantaviruses: a global disease problem. **Emerging Infectious Diseases**, v. Apr-Jun 3, n. 2, p. 95–104, 1997.
- [4] LEE, H.W.; LEE, P.W.; et al. Isolation of the etiologic agent of Korean Hemorrhagic fever. **The Journal of infectious diseases**, v. 137, n. 3, p. 298–308, 1978.
- [5] GAJDUSEK, D.C. Virus hemorrhagic fevers. **The Journal of Pediatrics**, v. 60, n. 6, p. 841–857, 1962.
- [6] NICHOL, S.T.; SPIROPOULOU, C.F.; et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. **Science**, v. 262, n. 5135, p. 914 LP – 917, 1993.
- [7] SUS (2017). Situação epidemiológica do Hantavírus. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/708-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/hantavirose/11304-situacao-epidemiologica-dados>. Acessado em 4 dez. 2017.
- [8] RABONI, S.M.; LEVIS, S.; et al. Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 58, n. 1, p. 89–97, 2007.
- [9] PEREIRA, S.S.; MOREIRA-DILL, L.S.; et al. Novel camelid antibody fragments targeting recombinant nucleoprotein of Araucaria hantavirus: A prototype for an early diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2014.
- [10] RIQUELME, R.R.; RIQUELME, M.; et al. Hantavirus Pulmonary Syndrome, Southern Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1438–1443, 2003.
- [11] YAMADA, T.; HJELLE, B.; et al. Antibody responses to Four Corners hantavirus infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*): identification of an immunodominant region of the viral nucleocapsid protein. **Journal of Virology**, v. 69, n. 3, p. 1939–1943, 1995.

- [12] RICCI, F.; ADORNETTO, G.; et al. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.
- [13] LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J.; et al. Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.
- [14] LEDERER, S.; LATTWEIN, E.; et al. Indirect Immunofluorescence Assay for the Simultaneous Detection of Antibodies against Clinically Important Old and New World Hantaviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 4, 2013.
- [15] DANIELS, J.S.; POURMAND, N. Label-free impedance biosensors: Opportunities and challenges. **Electroanalysis**, v. 19, n. 12, p. 1239–1257, 2007.
- [16] CLARK, L.C.J.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29–45, 1962.
- [17] MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v. 8, n. August, p. 14, 2004.
- [18] SHARMAT, A.; ROGERS, K.R. Biosensors. **Meas. Sci. Technol.**, v. 5, p. 461–472, 1994.
- [19] PADULA, P.J.; ROSSI, C.M.; et al. Development and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein. **Journal of Medical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 149–155, 2000.
- [20] LUCARELLI, F.; TOMBELLI, S.; et al. Electrochemical and piezoelectric DNA biosensors for hybridisation detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, n. 2, p. 139–159, 2008.
- [21] BERGGREN, C.; BJARNASON, B.; et al. Capacitive biosensors. **Electroanalysis**, v. 13, n. 3, p. 173–180, 2001.
- [22] BERGGREN, C.; JOHANSSON, G. Capacitance measurements of antibody-antigen interactions in a flow system. **Analytical chemistry**, v. 69, n. 18, p. 3651–3657, 1997.
- [23] YBARRA, G.; MOINA, C. Fundamentals and applications of immunosensor. **Advances in Immunoassay Technology**, p. 111, 2012.
- [24] LUPPA, P.B.; SOKOLL, L.J.; et al. Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 314, n. 1–2, p. 1–26, 2001.
- [25] WANG, J. **Analytical Electrochemistry**. John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [26] CARVALHAL, R.F.; FREIRE, R.S.; et al. Polycrystalline gold electrodes: A

comparative study of pretreatment procedures used for cleaning and thiol self-assembly monolayer formation. **Electroanalysis**, v. 17, n. 14, p. 1251–1259, 2005.

[27] ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, p. 1533–1554, 1996.

[28] MILLER, C.; CUENDET, P.; et al. Adsorbed w-hydroxy thiol monolayers on gold electrodes: evidence for electron tunneling to redox species in solution. **Journal of Physical Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 877–886, 1991.

[29] ARYA, S.K.; SOLANKI, P.R.; et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810–2817, 2009.

[30] WANG, Z.H.; JIN, G. Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 285, n. 2, p. 237–243, 2004.

[31] YUN, D.; SONG, M.; et al. Highly Sensitive and Renewable Amperometric Urea Sensor Based on Self-Assembled Monolayer Using Porous Silicon Substrate. **Journal of Korean Physical Society**, v. 47, n. November, p. 445–449, 2005.

[32] YANG, Y.; TU, Y.; et al. A label-free immunosensor for ultrasensitive detection of ketamine based on quartz crystal microbalance. **Sensors**, v. 15, n. 4, p. 8540–8549, 2015.

[33] BRAIEK, M.; ROKBANI, K.B.; et al. An electrochemical immunosensor for detection of Staphylococcus aureus bacteria based on immobilization of antibodies on self-assembled monolayers-functionalized gold electrode. **Biosensors**, v. 2, n. 4, p. 417–426, 2012.

[34] FERREIRA, A.A.P.; YAMANAKA, H.; et al. Voltammetric Studies on Gold Electrode Modified with SAM for the Biosensors Development. **Ibersensor**, p. 27–29, 2006.

[35] SCOUTEN, W.H.; LUONG, J.H.T.; et al. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 5, p. 178–185, 1995.

[36] CROSSON, C.; ROSSI, C. Quartz crystal microbalance immunosensor for the quantification of immunoglobulin G in bovine milk.pdf. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 453–459, 2013.

[37] EISSA, S.; L'HOCINE, L.; et al. A graphene-based label-free voltammetric immunosensor for sensitive detection of the egg allergen ovalbumin. **The Analyst**, v.

138, n. 15, p. 4378, 2013.

[38] MACDONALD, J.R. **Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and Applications**. John Wiley & Sons, Inc. 2005.

[39] SANTOS, C.S.; MOSSANHA, R.; et al. Electrochemical Immunosensor for Qualitative Diagnosis of the American Trypanosomiasis Based on Gold Modified with 3-Mercaptopropionic. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 163, n. 5, p. B158–B162, 2016.

[40] O'SULLIVAN, C.K.; GUILBAULT, G.G. Commercial quartz crystal microbalances- theory and applications. **Biosensors & bioelectronics**, v. 14, p. 663–670, 1999.

[41] SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zue Wägung Dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, p. 206–222, 1959.

[42] POURBAIX, M. **Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions**. Oxford; New York: Pergamon Press, 1966.

[43] PORTER, M.D.; BRIGHT, T.B.; et al. Spontaneously Organized Molecular Assemblies. 4. Structural Characterization of n-Alkyl Thiol Monolayers on Gold by Optical Ellipsometry, Infrared Spectroscopy, and Electrochemistry. **Journal of American Chemical Society**, v. 109, n. 6, p. 3559–3568, 1987.

[44] AMATORE, C.; SAVÉANT, J.; et al. Charge transfer at partially blocked surfaces. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 147, p. 39–51, 1983.

[45] WINK, T.; ZUILEN, S.J. VAN; et al. Self-assembled monolayers for biosensors. **The Analyst**, v. 122, n. 4, p. 43R-50R, 1997.

[46] HERNA, D. Enzymatic Genosensor on Streptavidin-Modified Screen-Printed Carbon Electrodes. **Analytical chemistry**, v. 76, n. 23, p. 6887–6893, 2004.

[47] PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.E.; et al. Comparative Study of Different Cross-Linking Agents for the Immobilization of Functionalized Carbon Nanotubes within a Chitosan Film Supported on a Graphite - Epoxy Composite Electrode. **Analytical chemistry**, v. 81, n. 13, p. 5364–5372, 2009.